UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de biochimie

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur J. P. BARGETZI

UN COLLAGÈNE ACIDO-SOLUBLE DE LA VEINE SAPHÈNE DE VEAU: PURIFICATION ET QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biochimiques

par

Laszlo VADAS
de
Bienne (BE)

Thèse No 1930

F. Stettler - DISS-PRINT - Fribourg
1979

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de biochimie

FACULTÉ DES SCIENCES
Professeur J. P. BARGETZI

UN COLLAGÈNE ACIDO-SOLUBLE DE LA VEINE SAPHÈNE DE VEAU: PURIFICATION ET QUELQUES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences biochimiques

par

Laszlo VADAS
de
Bienne (BE)

Thèse No 1930

F. Stettler - DISS-PRINT - Fribourg
1979

La faculté des sciences, sur le préavis de Messieurs J-P. BARGETZI, professeur ordinaire et directeur de thèse, E. STEIN, professeur ordinaire et D. HERBAGE, professeur (Université Claude-Bernard, Lyon-Villeurbanne) autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENEVE, le 21 août 1979

Le Doyen:
B. LEVRAT

Thèse No 1930

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545903_0014

TABLE DES MATIERES

Abréviations

1. INTRODUCTION 1

1.2 Types de collagène 2

1.3 Biosynthèse du collagène 7

1.4 Pathologie du collagène 10

1.5 But du présent travail 12

2. PREPARATION DU COLLAGENE DE VEINE SAPHENE SUPERIEURE DE VEAU

2.1 Matériel et méthodes d'analyse 13

2.1.1 Détermination et vérification de la quantité de collagène 14

2.2 Résultats et discussion 15

2.2.1 Matériel et méthodes 15

2.2.2 Extraction et purification 15

2.2.3 Critères de pureté, homogénéité chimique 21

3. PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU COLLAGENE

3.1 Composition en acides aminés 24

3.1.1 Matériel et méthodes 24

3.1.2 Résultats et discussion 25

3.2 Détermination du poids moléculaire du collagène de veine 28

3.2.1 Filtration sur gel 28

3.2.2 PAGE-SDS 30

3.2.3 Vitesse de sédimentation 34

3.3 Microscopie électronique 39

3.3.1 Matériel et méthodes 40

3.3.2 Résultats et discussion 40

3.4 Teneur et composition en hydrates de carbone 43

3.4.1 Matériel et méthodes 43

4.3.1.1 Isolement de Gal-Hyl et de Glc-Gal-Hyl 44
3.4.2 Résultats et discussion 49
3.5 Analyse de la structure secondaire du collagène par dichroïsme circulaire 59
3.5.1 Partie expérimentale 60
3.5.2 Résultats et discussion 61
4. CONCLUSION 65
BIBLIOGRAPHIE 67

Abréviations

Tris :	Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane
SDS :	dodécyle sulfate de sodium
BSA :	albumine de sérum bovin
UV :	ultraviolet
PM :	poids moléculaire
GC :	chromatographie en phase gazeuse
a.a. :	acide aminé
Hyl :	hydroxylysine
Hyp :	3- et 4-hydroxyproline
SLS :	fibres "Segment Long Spacing"
FLS :	fibres "Fibrous Long Spacing"
CAP :	protéines d'attachement cellulaire
GlcN :	glucose-amine
GalN :	galactose-amine

1. INTRODUCTION

Une variété considérable de tissus conjonctifs ayant des fonctions et des structures différentes est largement répandue dans le règne animal. Ces tissus contiennent d'abord des cellules jointives que sont les fibroblastes. Différenciées, ces cellules sécrètent des protéines et des polysaccharides en quantités qui s'accumulent dans leur entourage et s'organisent en une structure biphasique: 1) isotrope, hydratée et soluble, dont la substance de liaison, le milieu biologique, 2) anisotrope, fibrillaire, géométriquement disposée en cercles orientés de fibres non-dissoutes, visibles microscopiquement, c'est le réseau fibrillaire: collagène, élastine, protéoglycans.

Certaines caractéristiques qui distinguent les tissus conjonctifs peuvent être attribuées à la variation de proportion des composants de la matière intercellulaire, mais dans de nombreux tissus, ces proportions sont similaires ou identiques, malgré une différence de fonction biologique et de structure évidente. Le collagène par exemple, la protéine la plus abondante du règne animal, représente le 70% du poids sec aussi bien dans le tendon, que dans la peau et la cornée, malgré les architectures et les propriétés physiques très différentes de ces trois tissus.

Dans tous les tissus étudiés jusqu'ici, les molécules de collagène se sont révélées très semblables: ce sont des molécules plus ou moins rigides, de forme cylindrique, comprenant trois chaînes polypetidiques en conformation "triple hélice" typique des ces protéines (1)(cf.chap.3.5.2). Cependant, les évidences accumulées durant les dernières années ont montré que de tissu à tissu, ou encore à l'intéreur d'un même tissu, les molécules de collagène peuvent différer de par leur structure primaire ou par des modifications covalentes concernant l'hydroxylation de résidus Pro et la glycosylation de certains résidus Hyl ou d'autres a.a. portant des fonctions aliphatiques. L'influence de cette hétérogénéité sur la structure et la fonction biologique est encore imparfaitement comprise.

1.2 Types de collagène

L'unité de base des fibres de collagène est la molécule de tropocollagène qui, aux conditions physiologiques, s'organise en fibres insolubles, en s'agrégeant spécifiquement entre elles et avec d'autres fibrilles préformées. Le "monomère" a un volume qui prend la forme d'un long cylindre d'environ 300 nm de long sur 1,5 nm de diamètre, il est formé par les trois chaînes de plus de 1000 a.a. chacune. Chaque chaîne polypeptidique est, pour la plus grande part de son extension linéaire, enroulée en hélice, pour elle-même. Cette hélice, dite primaire, diffère fortement d'une configuration α ou β ou autre comme dans les protéines globulaires. C'est une hélice lâche, de chiralité gauche; elles sont disposées parallélement par groupes de 3, leur résidu N-terminal étagé au même niveau radial, sans qu'interviennent nécessairement de liaisons covalentes stables, au stade où les unités tropocollagènes sont extrudées dans le milieu extracellulaire par les fibroblastes. Ces trois hélices s'enroulent conjointement autour de l'axe géométrique commune de chaque triade; cette hélice secondaire est à pas très large et de chiralité droite (cf.chap. 3.5).

La séquence du millier d'a.a., ou à peu près, qui compose chaque chaîne, présente cette particularité d'avoir un long segment central où se répète d'un bout à l'autre un même motif séquentiel: Gly-Y-X, où Y est Pro et X est Hyp à peu près 1 fois sur 3, dans les autres cas Y et X sont d'autres a.a., polaires ou non, mais jamais Cys ou Trp et très rarement Tyr.

Les deux extrémités des chaînes α, peptides d'une cinquantaine d'a.a. au maximum, sont entièrement dépourvus du triplet Gly-Pro-X, et leur composition, polaire et riche en hydroxyles et fonctions ionisables, tend préférentiellement vers une configuration d'hélice α, comme les protéines globulaires pauvres en a.a. hydrophobes. C'est d'ailleurs ce qui a valu à ces terminaisons de chaînes l'appellation, fautive en principe, d'extensions peptidiques.

Le bilan global, dans cette composition, est singulier, comparé à la quasi totalité des autres protéines, car en fait que 3

chaîne moléculaire

- GLY - Y - X -

haîne polypeptidique

haîne α dans la
riple hélice

riple hélice de
ropocollagène

nité moléculaire
e tropocollagène

3000 A

15 A

ibre de
ollagène

700 A

ssu conjonctif
es fibres, déposées
n couches, sont
ignées à angle droit)

Figure 4: Schéma de la formation des fibres de collagène dans le tissu conjonctif

positions sur 10 sont occupées par des Gly (seule la séricine de la soie en contient autant) et deux par des Pro. On sait que les Pro, par les dispositions de leur cycle pyrrolique interne, sont incopatibles spatialement avec des structures en hélices normales α ou β, en imposant des ruptures aux segments géométriquement conformés dans les protéines. C'est la raison de l'existence de cette configuration hélicoïdale particulière qu'on appelle "hélice collagène" et des propriétés inusuelles de cette protéine, relatives notamment à la solubilité et la solvatation, puisque toute liaison peptidique où le composant amino - ici imino - est une Pro ou Hyp est dans l'impossibilité de former une liaison hydrogène avec un partenaire =C=O de la même chaîne ou d'une chaîne voisine. Par ailleurs, les Gly sont des jonctions d'encombrement minimum et sans leur présence dans la séquence répétitive du collagène, aucune forme d'hélice ne serait stériquement possible.

Les nombreuses études faites au cours des dernières années ont amené les chercheurs à classer les collagènes en 4, puis 6 ou 7 catégories génétiquement distinctes, appelées "types" de collagène. Le type I, le premier à être très bien caractérisé, contient deux chaînes α différentes sur trois. Pour ce type de collagène, essentiellement localisé dans l'os, le tendon, la cornée et la peau, la notation est la suivante: $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$ signifiant que le rapport entre les chaînes α1 et α2 est de 2:1 (2). Le collagène probablement le plus répandu est celui de type III, qui se compose de trois chaînes identiques $[\alpha 1(III)]_3$. Il existe particulièrement dans la structure de la peau des nouveau-nés et dans le système cardio-vasculaire mais semble, par contre, totalement absent du tendon et de l'os. Le collagène de type IV, spécialement localisé dans les membranes basales, se distingue des autres collagènes par l'absence de striations visibles au microscope électronique. Ces stries sont dues à l'alternance de segments alignés radialement, les uns apolaires (riches en résidus Pro et Hyp) et les autres polaires. Une autre particularité de ce type de collagène est sa teneur élevée en hydrates de carbone, allant jusqu'à 20% du poids total, ce qui tend à vérifi-

TABLEAU I

Désignation	Forme moléculaire	Principales localisations connues	Caractéristiques
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$	os tendon peau cornée dentine paroi artérielle	- présence d'une chaîne α2 - moins de 10 Hyl par chaîne - faible contenu en hydrates de carbone
II	$[\alpha 1(II)]_3$	cartilage hyalin	- plus de 10 Hyl par chaîne - env. 10% d'hydrates de carbone
III	$[\alpha 1(III)]_3$	peau foetale et infantile paroi utérine système cardio-vasculaire	- contient des résidus Cys - teneur élevée en Hyp et Gly
IV	$[\alpha 1(IV)]_4$	membranes basales	- contenu élevée en 3-Hyp - plus de 20 Hyl par chaîne - peu de résidus Ala

TABLEAU I (suite)

Désignation	Forme moléculaire	Principales localisations connues	Caractéristiques
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$		- teneur très élevée en hydrates de carbone
V(?)	$\alpha A[\alpha B]_2$	placenta membranes foetales foie cirrhosé (3)	- plus de 20 Hyl par chaîne - 2-3 résidus Hyp par chaîne
VI(?)	$[\alpha A]_3$	placenta os	- teneur élevée en résidus Hyl - tout les hydrates de carbone sont présents sous forme de disaccharide Glc-Gal-
VII(?)	$[\alpha B]_3$	cartilage membrane synoviale	- pas ou peu de résidus 3-Hyp
VIII(?)	$\alpha C[\alpha B]_2$ ou $\alpha C[\alpha A]_2$ (4)	gencives peau de veau foetale	

er l'hypothèse qu'une haute teneur en glucides va de pair avec une organisation morphologique moins structurée du tissu conjonctif (5).

En 1976 Burgeson et al. (6) découvrent, dans des membranes foetales, deux nouvelles chaînes polypeptidiques qu'ils dénomment αA et αB, et présentent ces chaînes comme la découverte d'un collagène nouveau de composition $\alpha A[\alpha B]_2$; Kühn et al. (7) recensent le type V en 1978. Cette découverte est en partie contredite par Rhodes et Miller (8), qui ont isolé aussi les chaînes αA et αB du placenta, de l'os et du cartilage chez l'homme. Ces auteurs supposent que les deux chaînes existent sous des espèces moléculaires distinctes ayant la composition $[\alpha A]_3$ et $[\alpha B]_3$, respectivement. Le tableau I résume les qualités ou propriétés des divers types de collagène connus aujourd'hui.

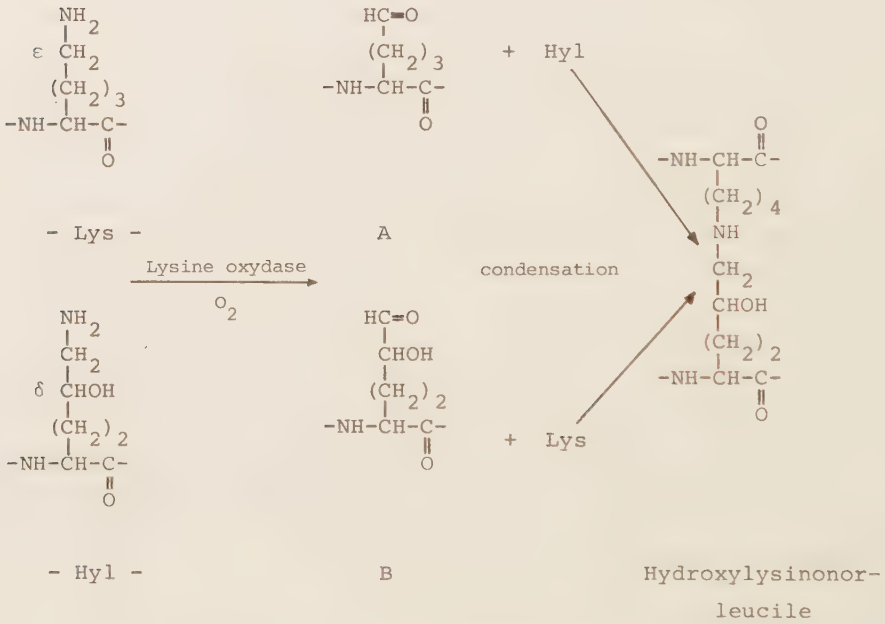
Puisque les synthèses de l'hydroxyproline et de l'hydroxylysine ne sont pas directement sous contrôle génétique, à la biosynthèse des chaînes, des variations importantes étaient prévisibles dans la composition des collagènes, non seulement de types différents, mais aussi dans un même type. Il en va de même pour la glycosylation des résidus Hyl par le galactose ou le disaccharide glucosyle-galactosyle, dont les proportions varient de tissu à tissu (9) (cf.chap.3.4.1.1).

1.3 Biosynthèse du collagène

Le lieu de la biosynthèse du collagène diffère suivant le type de collagène synthétisé. Les chondroblastes ou leurs dérivés synthétisent uniquement le collagène de type II, tandis que les cellules-mères épithéliales et endothéliales sécrètent les collagènes des membranes basales. Les ostéoblastes et les odontoblastes sont les lieux de prédilection de la synthèse préférentielle du collagène de type I, alors que les fibroblastes et les cellules de muscle-lisse synthétisent les types I et III.

La biosynthèse complète du collagène englobe de nombreuses étapes non observées pour les autres protéines: hydroxylation de

certains résidus Pro et Lys, formation de liaisons intra- et inter-chaînes (cross-links) après avoir produit des allysines, seuls a.a. à fonctions aldéhydiques.



A : résidu de l'acide α-aminoadipique δ-semialdéhyde

B : résidu de l'acide δ-hydroxy,α-aminoadipique δ-semialdéhyde

Figure 1: Formation d'un des "cross-links" les plus fréquent dans le collagène.

La récente découverte d'un précurseur procollagène de la molécule de tropocollagène (11) a permis d'expliquer la sécrétion du collagène et son immédiate agrégation à la fibrillogenèse. Le procollagène, dans les conditions physiologiques, est soluble; sa différence d'avec la molécule de tropocollagène provient d'extensions aussi bien C- que N-terminales contenant des

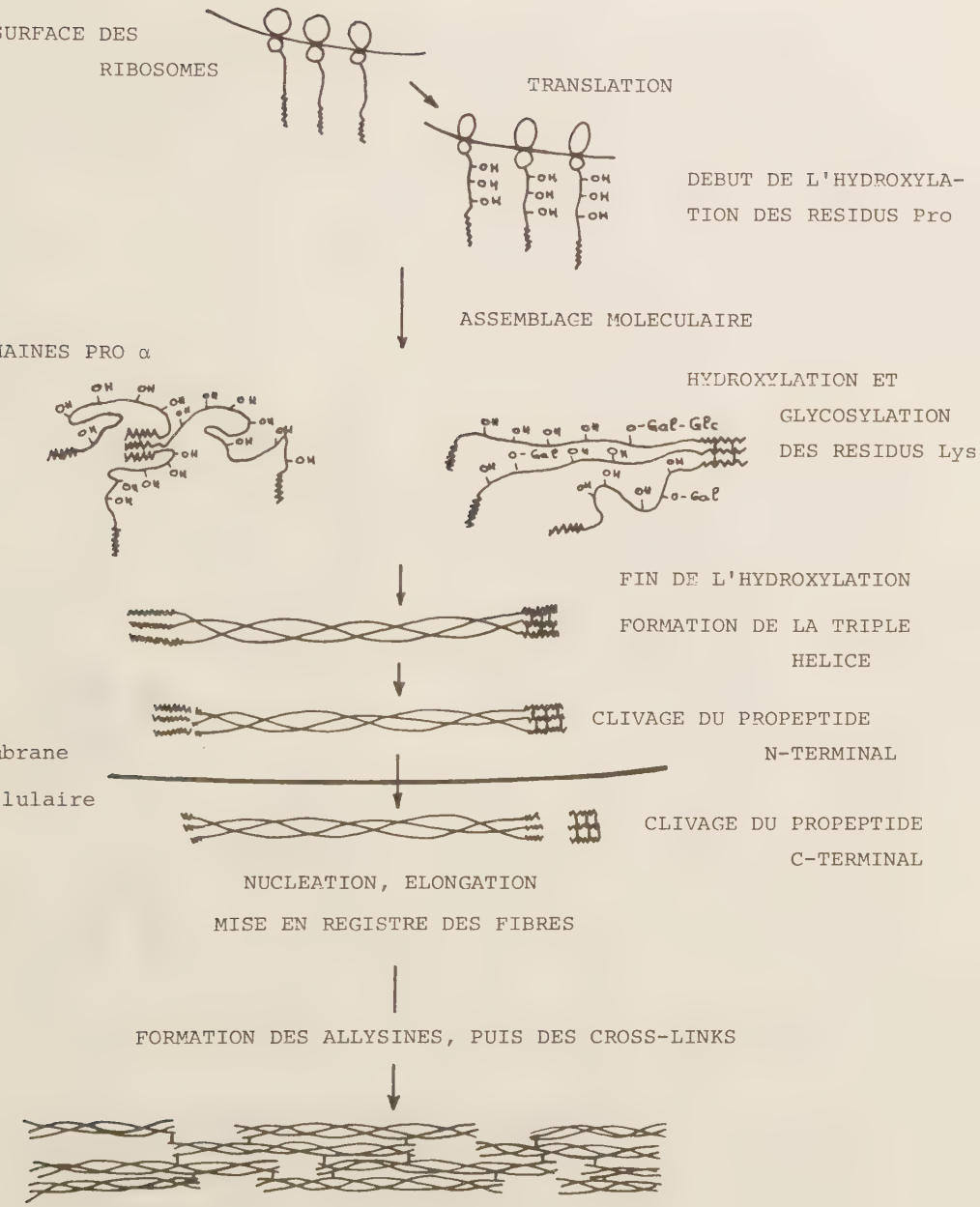


Figure 3: Biosynthèse du collagène (93)

ponts disulfures inter- et intramoléculaires, respectivement. C'est l'hydrolyse de ces extensions terminales, n'ayant pas une conformation triple hélice, par deux procollagène-peptidases qui permet le dépôt des fibres de collagène et la formation de "cross-links".

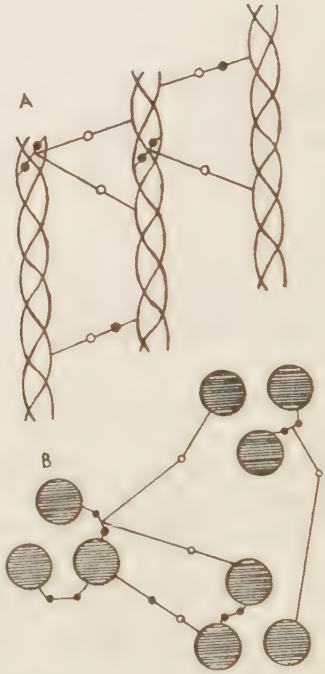


Figure 2: Schéma général de la formation de cross-links intermoléculaires par réaction d'aldéhydes avec d'autres a.a. (10).

A: vue latérale

B: coupe transversale

aldéhydes

autres groupes réactifs

1.4 Pathologie du collagène

La complexité de la biosynthèse du collagène explique partiellement les nombreuses maladies des tissus conjonctifs; celles-ci touchent également l'homme, parfois même très grièvement. Un des syndromes d'Ehlers-Danlos, caractérisé par une extensibilité extrême de la peau, le syndrome de Marfan qui affecte l'aorte jusqu'à la rendre très fragile (nombreuses ruptures) et l'ostéo-

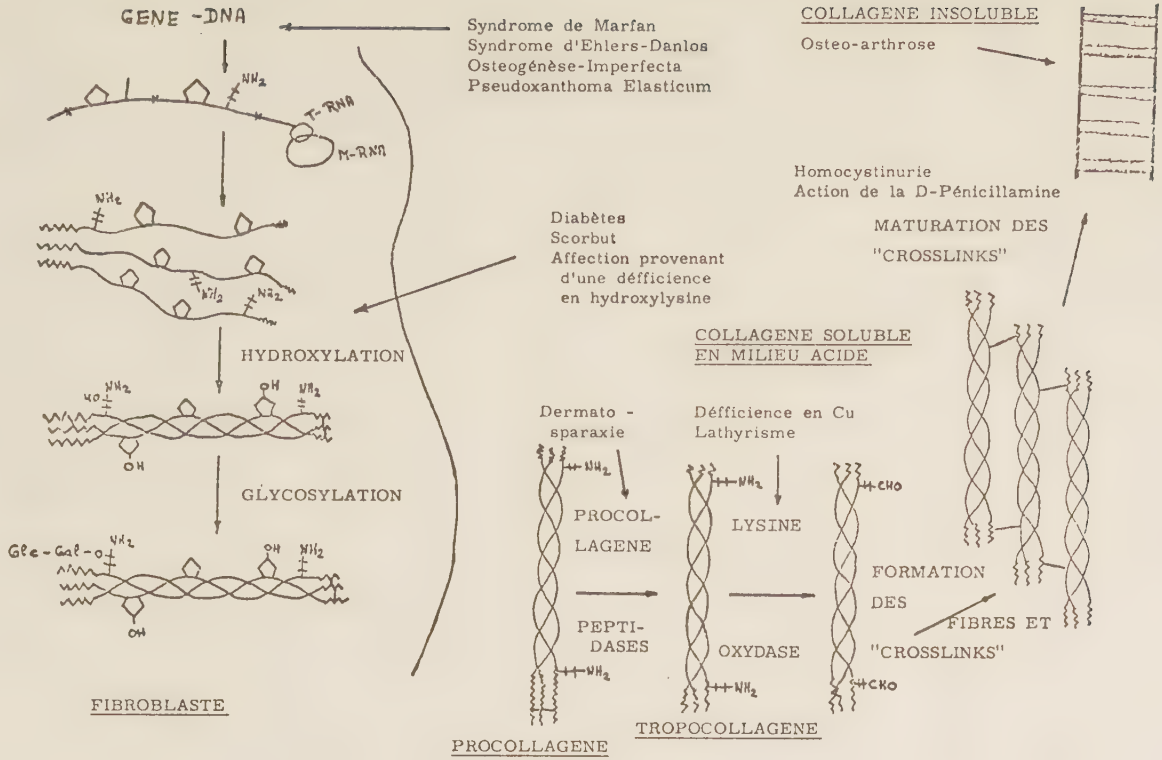


Figure 5: Maladies du collagène provenant d'anomalies de la biosynthèse(78)

genèse imperfecta qui rend les os particulièrement friables, en sont les exemples les plus marquants. La maturation des "cross-links", qui engendre des agrégats entre les fibrilles de plus en plus insolubles avec l'âge, touche également la pathologie du vieillissement. La coagulation sanguine peut aussi être perturbée (lésions athérosclérotiques), car la seule macromolécule qui ait été reconnue pour induire l'adhésion des plaquettes sanguines est le collagène (12).

1.5 But du présent travail

La majeure partie des études du conjonctif vasculaire concerne le collagène des artères ou de la valvule cardiaque, et très peu de celles-ci traitent du collagène des veines (13,14,15, 17). Pourtant la fonction biologique de la veine est très probablement dépendante du contenu et de la structure des collagènes qui s'y trouvent, car ils représentent la partie la plus importante de ses constituants (jusqu'à 50% du poids sec pour le seul collagène).

Avant d'entreprendre une recherche sur d'éventuelles modifications structurales et biologiques des veines variqueuses humaines, il a semblé utile d'étudier les collagènes des tissus sains correspondants. Malheuresement, ne pouvant obtenir de veines saines humaines, pour des raisons évidentes, nous avons dû choisir, pous des raisons pratiques, de caractériser la veine saphène supérieure de veau. Notre étude s'est particulièrement attachée à la description physico-chimique du collagène extrait sans l'intervention d'aucun traitement protéolytique.

Parallèlement à notre travail, Marie-Antoinette Bianco a entrepris des recherches sur ce même matériel et aussi sur le collagène de veines saphènes extrait par digestion à la pepsine, puis sur des collagènes de veines saphènes humaines atteintes de varicosités (16).

2. PREPARATION DU COLLAGENE DE VEINE SAPHENE SUPERIEURE DE VEAU.

Toutes les méthodes d'extraction et de purification des collagènes décrites durant les dernières années peuvent être classées en deux catégories :

a) les méthodes usant de digestions enzymatiques et celles utilisant des conditions hydrolytiques lors de l'une ou l'autre des étapes de purification

b) les préparations par des procédés non dégradants

Nous avons d'emblée exclu les méthodes de la classe a) et avons testé, d'abord sur les veines saphènes de boeuf, plusieurs méthodes d'extraction, notamment celle décrite par Bargetzi et Jampen (17).Les différents paramètres de cette dernière méthode de purification étant mal précisés, de même que le trop large éventail d'âges des bovins considérés, nous ont poussé à mettre au point une autre méthode de préparation. Elle reprend une idée déjà émise en 1933 par Fauré-Fremiet(20), qui consiste à solubiliser le collagène en solution acide-diluée (acide acétique ou acide formique). De plus elle s'inspire, outre de celle de Jampen et Bargetzi (17), de plusieurs expériences sur d'autres collagènes, particulièrement de celle de Schofield (18) et de Steven (19).Nous basant encore sur les résultats et constatations de plusieurs autres laboratoires, nous avons préféré effectuer nos premières analyses avec un collagène plus soluble que celui déjà cité, c'est à dire extrait d'un tissu plus jeune, et avons décidé de prélever les veines saphènes supérieures de veaux, ces derniers ne dépassant pas lors de l'abattage l'âge de six mois.

2.1 Matériel et méthodes d'analyse.

Comme il n'était pas possible de déterminer le quantité de collagène, soit dans un homogénat de tissu, soit en solu-

tion, par les méthodes classiques utilisées en biochimie pour le dosage des protéines totales,(méthodes de Lowry, Biuret ou dosage de l'azote minéral) il nous est apparu que le moyen le plus adéquat était de déterminer Hyp et Hyl par analyse d'acides aminés, après une hydrolyse dans HCl 6N. Une fois connue cette composition (cf. chap.3.1.2.), il était aisé de connaître la quantité de collagène présente dans le milieu analysé.

2.1.1 Détermination et vérification de la quantité de collagène.

Afin de contrôler l'intégrité de la molécule de collagène, nous avons procédé à deux autres vérifications: électrophorèse de la protéine sur gel de polyacrylamide et observations des fibres de collagène, après fixation, à l'aide d'un microscope électronique.

2.1.1.1 "Disc-gel" électrophorèse.

Connaissant les profils de migration des différents types de collagène (21) sur gel d'acrylamide, en présence d'urée ou de SDS, nous avons pu comparer nos résultats avec ceux de la littérature concernant d'autres collagènes et ainsi observer l'absence ou la présence de matériel contaminant, provenant soit du traitement de dégradation, soit d'une purification insuffisante.

2.1.1.2 Microscopie électronique.

La structure de la fibre normale de collagène présente, après fixation négative (negative staining), une image particulière en microscopie électronique: une succession de bandes claires et sombres, qui permettent de calculer une périodicité désignée par D, en outre la fibrillation du collagène en présence d'ATP induit la formation de fibres SLS (segment long-spacing fibres) qui ont la particularité d'être mises en registre sans chevauchement d'autres molécules de tropocollagène voisines permettant ainsi la détermination de la longueure totale d'une molécule. Cette mesure est importante, car

la plupart des traitements hydrolytiques racourcissent les extrémités de la protéine, sans pour autant inhiber la formation de fibres, normales ou de type SLS.

2.2 Résultats et discussions

2.2.1 Matériel et méthodes

DEAE-cellulose microgranulaire Whatman DE-52, CM-cellulose microgranulaire Whatman CM-32, tubes à dialyse Visking(N°44120 Serva), Tris (hydroxyméthyl)aminométhane purum (Fluka) recristallisé dans l'éthanol, urée Ultra pure (Schwarz/Mann). Tous les autres réactifs sont de pureté analytique. Le cryostat utilisé est de type TK 64 (Colora) tandis que les rotors GSA et SS-34 (Beckman) ont été utilisés, selon les volumes à sédimenter, dans une centrifugeuse RC-2B (Beckman).

2.2.2 Extraction et purification

Les veines saphènes supérieures de veau sont prélevées par dissection, environ 10 minutes après la mort de l'animal, dans les locaux même des abattoires. Les veines sont immédiatement immergées dans une solution saline 0.9% préalablement refroidie à 4°C, et maintenues immergées dans un bain de glace durant toutes les manipulations subséquentes. Les segments de veines, débarrassés au scalpel de tout autre tissu adhérant, sont coupés en petits fragments d'environ 1 cm de longueur, et à nouveau immergés dans l'eau distillée à 0°C. Un prélèvement fournit ordinairement 100g de veines humides (50 - 60 veines) en moyenne. Si plusieurs prélèvements sont nécessaires, les veines lavées à l'eau sont congelées à -25°C, et ainsi conservées en flacon fermé. Les veines congelées, ou celles fraîchement lavées, sont ensuite réunies, lavées deux fois dans 2l de solution physiologique, hachée dans un hachoir à viande, puis mises en suspension dans 2,5l d'acétate de Na 0.5M à pH 6.3. La suspension est agitée pendant 20h. Elle est ensuite centrifugée pendant 1h à 1500g, l'éluat est écarté

et le sédiment de tissu, après un rapide séchage sur une toile de fromager, est remis en suspension dans 2l d'acétate de Na 0.5M à pH 6.3 et agité durant 20h. Cette opération de lavage est répétée une fois.

La première extraction de collagène de veines s'effectue par transvasage de la pulpe de tissu sec dans 2l de citrate de Na 0.1M à pH 4.3, et en maintenant l'agitation durant 20h. Après ce laps de temps, la suspension est centrifugée à 10.000g durant 30 minutes, puis le sédiment est à nouveau dispersé dans 2l de tampon citrate 0.1M à pH 4.3 sous agitation pendant 20h. Cette opération est répétée une troisième fois. Les trois éluats réunis sont ensuite clarifiés par centrifugation à 39.000g durant 1h puis, pour faire fibriller le collagène, dialysés contre une solution de monophosphate de sodium 0.02M à pH 8.2.

Le sédiment , pour sa part, est lavé avec plusieurs litres d'eau distillée froide, séché durant un bref instant sur la toile de fromager, puis dispersé dans 2l d'acétone refroidi à 4°C puis maintenu sous agitation durant 24h. Après décantation par gravité, les fragments de veines sont immergés dans 2 l d'acétone refroidi à -30°C, agités et maintenus à cette température à l'aide d'un cryostat pendant 24 heures. Le matériel ainsi traité est ensuite séché sous pression réduite à 4°C et dissous dans 2 litres d'acide acétique 0.5M. Cette opération constitue l'extraction principale du collagène de veine saphène de veau. Elle dure de 48 à 72 heures, et la préparation de collagène est obtenue en centrifugeant la suspension durant 2 h à 40.000g et en filtrant cette solution à travers une laine de verre afin d'éliminer tout le matériel non-dissous flottant en surface. Pour éliminer toute substance de faible poids moléculaire, ici inférieur à 20.000, la solution de collagène est dialysée contre une solution d'acide acétique 0.5M durant deux jours, en changeant fréquemment l'acide. Les fibres de collagène sont recueillies par dialyse contre une solution de Na_2HPO_4 0.02M à pH 8.2, ou par adjonction, goutte à goutte, de NaOH 30% jusqu'à ramener le pH à proxi-

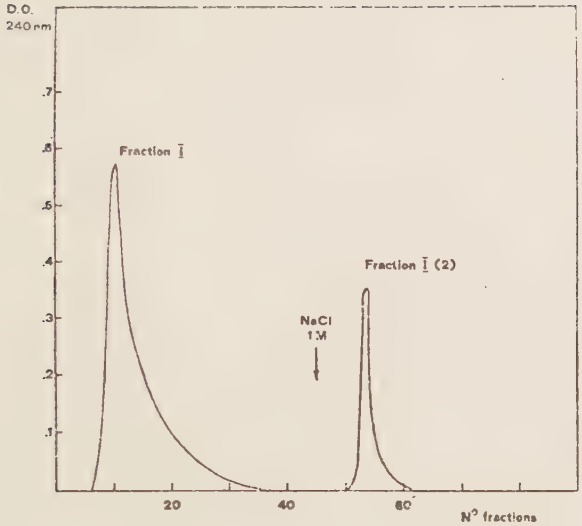


Figure 6 : Chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose de la solution acétique de collagène (fraction H). (voir conditions sous extraction et purification; les dénominations sont identiques à celles indiquées dans le schéma de la purification)

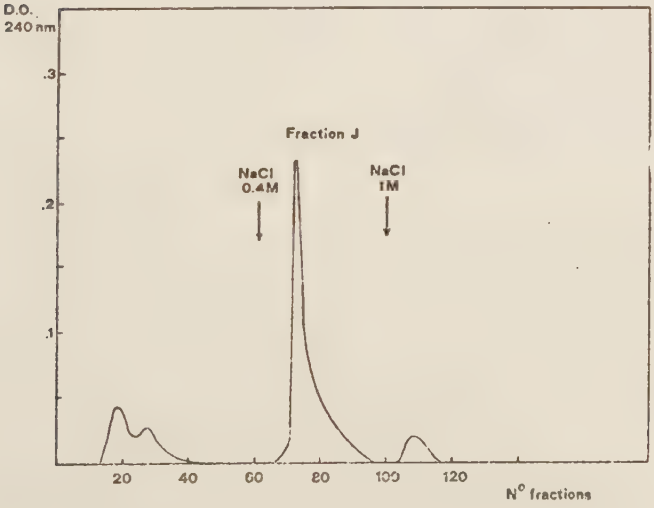


Figure 7 : Chromatographie d'échange ionique sur CM-cellulose de la fraction I. (conditions : idem fig. précédente; les flèches indiquent les changements de la concentration de sel du tampon)

mité de la neutralité, et sous agitation constante de la solution. Les fibres de collagène sont ensuite collectées par centrifugation, puis à nouveau dissoutes et refibrillées comme déjà décrit.

Le sédiment de la première extraction par l'acide est à nouveau dissous dans 2l d'acide acétique 0.5M et le collagène en est extrait et purifié de la même manière.

Afin d'éliminer les protéoglycans qui auraient pu s'associer aux fibres de collagène, nous avons appliqué la méthode décrite par Miller (22) pour un même cas, tout en modifiant légèrement les conditions expérimentales, notamment en effectuant la séparation des différents composants en présence de 2M urée, afin d'éviter toute refibrillation de la protéine. 100 mg de collagène du premier extrait sont dissous dans 60 ml de tampon Tris-HCl 0.03M à pH7.5 contenant urée 2M, puis la solution est clarifiée par centrifugation (40 000 x g durant 30 minutes) avant d'être chromatographiée à travers une colonne de DEAE-cellulose DE-52, prééquilibrée dans le même tampon. Le collagène est élué à l'aide du même tampon, mais de force ionique supérieure (0.2M NaCl), tandis que les protéoglycans et les complexes protéines-polysaccharides ne le sont qu'à force ionique 1M en NaCl. Le débit de la colonne est fixé à 100 ml/h, les fractions collectées sont de 5 ml. Leurs absorbances sont lues à 240 nm. Les fractions contenant le collagène sont réunies, dialysées durant 3 jours contre de l'eau courante, puis lyophilisées. La rechromatographie d'une solution de collagène sur une colonne de CM-cellulose et son élution par un gradient de NaCl 0- 1M n'a révélé la présence que d'une seule fraction de protéine de nature collagène et un petit pic de contaminant hétérogène, non-retenu par l'échangeur de cations. Les propriétés physico-chimiques des fractions de collagène issues des deux chromatographies sur celluloses substituées se sont révélées presque identiques. Les fractions éluées sur CM-cellulose n'ont pu être caractérisées plus efficacement. Le collagène récolté est considéré comme pur, s'il est exempt de sels, sinon il est

SCHEMA DE LA PURIFICATION

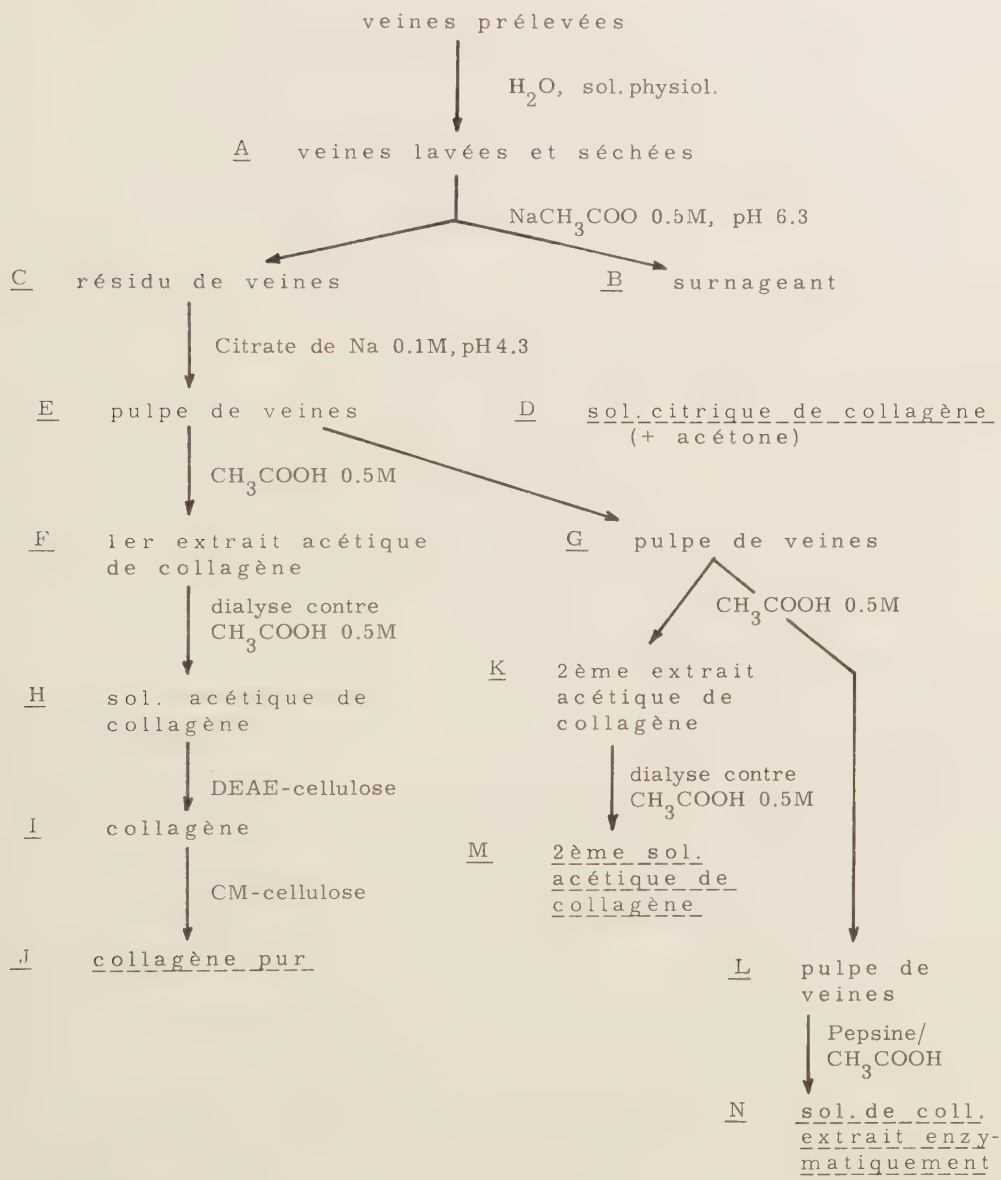


TABLEAU II

Résultats de la purification du collagène de veine saphène de veau

Etapes	Poids sec du résidu* (g)	Poids de collagène* (g)	% de collagène solubilisé
A	100	47,8	
B	10	--	--
D	11	2	4,2
F	8	3,6	7,5
H	4	3,6	
I	3,2	3,2	6,7
J+	3,2	3,2	6,7
K	3,3	2	4,2
M	2,3	1,9	4,0
N	36,2	36,2	75,7

% de collagène solubilisé par des procédés non dégradants: 15,9

% de collagène solubilisé par pepsinisation: 75,7

% de collagène total solubilisé: 91,6

* Ces valeurs ont été déterminés en prélevant des aliquotes de chaque échantillon qui sont ensuite hydrolysées et analysées à l'A.A.A., en admettant que 18 résidus Hyl sont présents par molécule de tropocollagène de PM d'environ $3 \cdot 10^5$.

\+ Valeurs corrigées en tenant compte de la perte de collagène durant la chromatographie.

dissous dans de l'acide acétique, refibrillé puis lavé, avant d'être séché à nouveau par lyophilisation. Le collagène qui n'est pas lavé immédiatement est conservé dans un flacon à -20°C, ou alors parfois sous forme de solution acétique à 4°C. Un traitement à la pepsine de la pulpe de veine restante permet encore de solubiliser la majeure partie du collagène total et aussi d'extraire du collagène de type III (cf. mémoire de thèse M-A. Bianco (16)).

Le peu de variation des résultats obtenus au terme d'une préparation a montré que ni la provenance géographique ou animale des veaux, ni les saisons (fourrage variable selon les saisons) n'influencent de façon appréciable la structure et la composition des veines saphènes.

Nous pouvons ainsi conclure que 47 à 48% du poids sec de la veine étudiée ici sont composés de collagène, ce qui corrobore assez bien les travaux de Svejcar (13) et Laszt (14), qui ont trouvé chez l'homme adulte un pourcentage légèrement supérieur,de l'ordre de 51 à 52%.

Pour nos investigations ultérieures et pour des raisons pratiques évidentes, nous nous sommes attachés à caractériser le collagène soluble et particulièrement celui qui est solubilisé par les acides dilués sans traitement hydrolytique. Ce collagène représente le 10 à 12% du collagène total et partant, ses propriétés ne peuvent être généralisées à l'ensemble du collagène de veine, mais offre néanmoins des points de comparaison solides avec d'autres collagènes de sources diverses.

2.2.3 Critères de pureté, homogénéité chimique.

Les différentes méthodes qui ont permis d'évaluer la pureté chimique et l'homogénéité du collagène soluble sont les suivantes :

- Electrophorèse en "disc-gel"

La migration électrophorétique des différents composants du collagène est déterminée sur un gel de polyacrylamide (5%)

en présence de 10% urée, selon la méthode de Reisfeld (23). Ces séparations ont lieu à température ambiante et le courant est maintenu constant à 4 mA par gel. Le tampon β-alanine-ac. acétique est préparé selon la méthode de Stark et Kühn (21). Avant chaque migration, la solution de collagène est saturée en urée. La coloration des protéines, après migration, est effectuée à l'aide d'une solution de 1% Amidoschwarz dans ac. acétique 7% (coloration durant 20 minutes à 60°C, décoloration électrophorétique dans ac. acétique 7%).

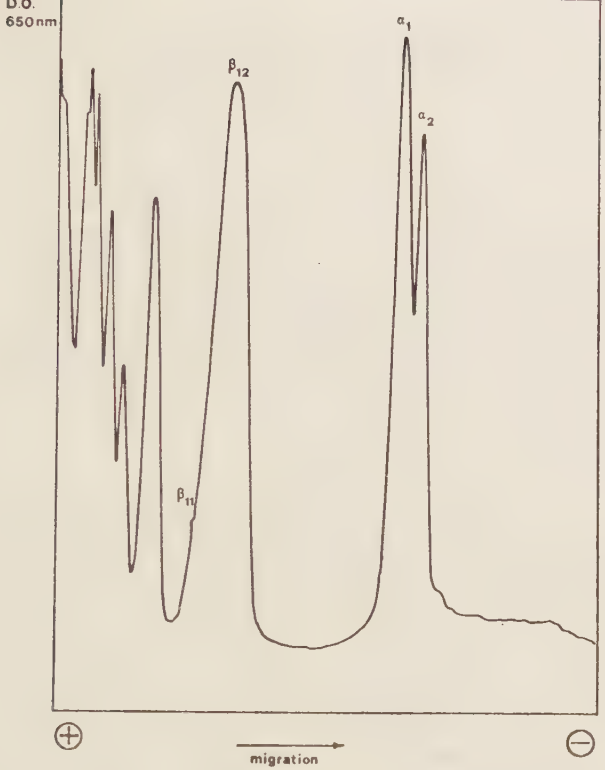
L'image des bandes ainsi obtenue est tout à fait conforme à celle d'autres collagènes du même type (21,23,24). Ces images ne révèlent la présence d'aucun contaminant de PM inférieur à celui de α2(I), ce qui signifie qu'aucune coupure hydrolytique n'a affecté la molécule de tropocollagène.

- Dansylation

A l'égal de la plupart des collagènes de vertébrés, ce collagène de veine possède un acide pyroglutamique N-terminal et un des 3 acides aminés hydrophobes: Leu, Ile ou Val, en pénultième position dans la chaîne α1(I) (16).

- Vitesse de sédimentation

Cette méthode a permis, grâce aux clichés pris en chambre photographique dans une ultracentrifugeuse équipée du système optique Schlieren, d'assigner à la molécule de tropocollagène, dans un état non dénaturant ou de dénaturation réversible, un seul et unique coefficient de sédimentation, et de lui en attribuer trois après dénaturation soit thermique, soit par l'urée (cf. chap.3.2.3).



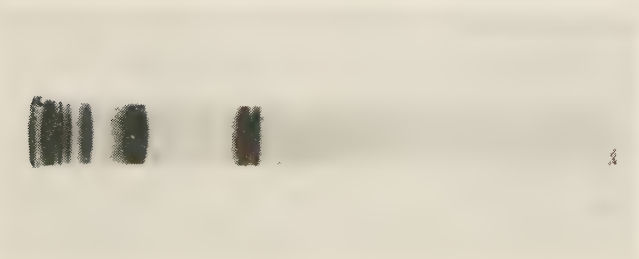


Figure 8 : Relevé densitométrique et photographique d'une migration électrophorétique du collagène soluble de veine, dans un gel de polyacrylamide, en présence d'urée.
(conditions: voir sous méthodes)

3. PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU COLLAGENE

3.1 Composition en acides aminés

La composition en acides aminés du tropocollagène de veine et de ses sous unités (chaîne α1 et α2) a été déterminées selon la méthode classique de Moore et Stein (25), après hydrolyse totale de la protéine dans HCl 6N. Trp est dosé séparément d'après la méthode de Lin et Chang (26). Une vérification de l'absence de CysH à groupement thiol libre a été effectuée par S-carboxyméthylation (Cresfield (27)).

3.1.1 Matériel et méthodes

Environ 0.5 mg de collagène est dissous dans 1 ml de HCl 6N, hydrolysé pendant 24, 48 et 72 heures à 108°C en série parallèles, en tubes pyrex scellés sous vide. L'hydrolysat est ensuite évaporé à sec, lavé à l'eau puis repris dans un volume connu (0.5-1 ml) de tampon citrate de Na 0.02M à pH2.2, avant d'être analysé sur un Amino Acid Analyzer Beckman Model 120C. L'analyseur est équipé d'une colonne de 56 cm de résine Beckmam AA-15. L'élution se fait par un système à trois tampons, selon la méthode préconisée par Gürther (28). Les a.a. basiques, particulièrement Trp et Hyl, sont séparés des autres a.a. par chromatographie sur résine Beckman PA-35 (colonne de 18 cm); élution par un tampon citrate de Na 0.35M en Na^+ à pH 5,28. Parallèlement, un échantillon de collagène, d'environ 0.2 à 0.3 mg est hydrolysé durant 24h à 108°C par 1 ml d'acide p-toluène sulfonique 3N, contenant 0.2% de tryptamine, pour servir à la détermination de Trp.

Le nombre de nanomoles dosées pour chaque résidu acide aminé est calculé par intégration des pics du diagramme d'élution, par triangulation et par comparaison avec un diagramme de calibration. Les valeurs indiquées pour les acides aminés instables en milieu fortement acide sont les valeurs extrapolées graphiquement à temps zéro. De même, afin d'éviter les erreurs de calcul dues à l'épaulement du pic Asp par Hyp,

des calibrations d'une série de rapports de concentration connus ont été préparés pour ces deux a.a. et un facteur de corrélation calculé.

3.1.2 Résultats et discussion

Les résultats indiqués au tableau III sont une moyenne d'au moins 5 analyses de 5 préparations différentes de collagène. Elles indiquent la composition en acides aminés des collagènes solubles de la veine saphène ramenée à la norme de 1000 résidus.

TABLEAU III

a.a.	Fraction F	σ	Fraction I*	Fraction I(2)*	Fraction J*
4-Hyp	95,0	1,90	93	--	89
Asx	50,6	1,00	48	61	51
Thr	20,2	0,38	20	37	21
Ser	39,8	0,98	45	238	45
Glx	83,4	1,05	79	140	81
Pro	106,1	1,05	113	20	117
Gly	306,1	2,46	317	183	313
Ala	112,2	1,51	105	76	103
Val	24,6	0,82	27	28	23
Met+	5,4	0,28	6	6	6
Ile	14,1	0,40	13	15	11
Leu	30,8	1,08	27	22	28
Tyr	5,7	0,32	6	13	6
Phe	14,8	0,43	14	22	14
Hyl	5,9	0,18	6	--	6
His	6,1	0,29	7	24	7
Lys	29,2	0,63	27	31	29
Arg	50,1	1,39	47	11	50
Cys	traces		--	--	--
Orn				79	

* Résultats exprimés en nombre entiers de résidus

\+ Déterminé après clivage par le CNBr
La fraction I(2) est la seconde fraction éluée de la résine de DEAE-cellulose et qui contient les polysaccharides.

Le tableau IV donne un aperçu des différentes compositions en a.a. des collagènes de type I et III, car ce dernier, presque toujours associé au type I, se retrouve aussi bien dans le conjonctif des vaisseaux sanguins que dans celui de peau.

TABLEAU IV

acides aminés	Veine saphène	Aorte (29)	Valve cardiaque (18)	Peau (I) (30)	Peau (III) (30)	Peau (III) (31)	Peau (I) (32)
Hyp	93	87,7	98,6	93	118	114	91
Asx	48	39,3	42,1	45	45	50	48
Thr	20	16,9	16,5	17	15	17	15
Ser	45	32,6	29,7	33	37	59	34
Glx	79	80,6	72,9	74	70	76	74
Pro	113	127,6	117,2	132	105	113	124
Gly	317	336	324,2	323	344	334	335
Ala	105	107,6	113,6	107	90	88	107
Val	27	25,9	26,6	21	14	16	22
Met	6	5,7	7,4	5	5	8	6
Ile	13	12,8	12,0	13	12	14	12
Leu	27	26,2	30,2	24	18	21	27
Tyr	6	2,6	3,4	2	2	2	4
Phe	14	13,0	11,6	12	8	11	13
Hyl	6	5,4	7,9	7	6	6	7
Lys	27	30,3	24,9	29	28	27	25
His	7	5,5	5,7	5	8	7	5
Arg	47	44	51	52	46	44	50
Cys	--	--	--	--	1,5	2	--

- Tous les résultats indiqués dans le tableau précédent concernent des collagènes de même origine bovine (veau)
- Concernant le collagène de l'aorte, il est à noter que le peptide α1-CB6 est certainement raccourci par le traitement alcalin qu'à nécéssité sa solubilisation en milieu acide.

La séparation des différentes chaînes de la molécule de tropocollagène et la détermination de leurs compositions respectives en a.a. ont été exécutés par M.-A. Bianco (16), comme aussi le clivage de la chaîne α1 par le bromure de cyanogène et la séparation des peptides ainsi obtenus par migration électrophorétique sur gel-gradient de polyacrylamide.

Au vu de ces résultats, il apparaît que le collagène de veine préparé suivant la méthode décrite ci-dessus ne diffère que très peu des autres collagènes de type I, la nuance se situant toutefois dans le contenu en Gly et Ser. L'explication de cette différence repose sur le fait que les parties N- et C-terminales, qui ont une structure différente de l'hélice collagène, sont formées en majorité d'acides aminés à chaînes latérales ionisées et qu'elles n'ont pas été partiellement scindées lors de l'extraction et de la purification. La même explication est également valable pour les résidus Tyr qui ont tous été localisés lors de la détermination de la séquence dans les parties terminales de la protéine: deux résidus dans le segment N-terminal et trois dans la partie C-terminale (33). D'autre part, le nombre de résidus Val et Phe, comme aussi le rapport Hyp/Pro inférieur à 1 (0.82), excluent pratiquement toute hypothèse d'une contamination par du collagène de type III (34). En outre, le profil du diagramme d'élution de la colonne CM-cellulose, lors de la séparation des chaînes α et β, est tout à fait comparable à ceux obtenus avec différents collagènes de type I, résultat d'ailleurs corroboré par les peptides répertoriés (nombre et masse moléculaire) après clivage de la chaîne α1 par le CNBr(16).

3.2 Détermination du poids moléculaire du collagène de veine saphène de veau.

Le poids moléculaire du collagène a été déterminé par trois méthodes différentes; les deux premières, filtration sur gel et électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, sont des méthodes comparatives utilisant des protéines de référence, tandis que la dernière, vitesse de sédimentation, définit directement l'état et les paramètres hydrodynamiques de la protéine native.

3.2.1 Filtration sur gel

3.2.1.1 Matériel et méthodes

Une colonne de 95 cm de hauteur et de 1,6 cm de diamètre, remplie d'un gel de Sepharose 4B (Sigma) équilibré dans un tampon Tris-HCl 0.05M à pH 7.4 et contenant $CaCl_2$ 1M, est éluée par le même tampon, à raison de 16 ml/h. L'absorbance de l'éluat est lue à 220 nm à l'aide d'un spectrophotomètre CE-12 CECIL Instruments (Cambridge). La colonne a été étalonnée grâce à des protéines de poids moléculaire connu: apoferritine (Schwarz/Mann), glutamate déhydrogénase du foie (bovin) (Boehringer), catalase (Worthington), collagène soluble de peau (Worthington), bleu-dextrane 2000 (Pharmacia).

3.2.1.2 Résultats

Les diagrammes d'élution représentant 5 séparations de protéines de référence et 3 de collagène sont présentés à la figure 9.

Au vu de ces résultats, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

- Le poids moléculaire de notre collagène de veine saphène est analogue à celui de peau, à savoir compris entre 280 000 et 300 000 daltons (32,35).
- Si la comparaison des résultats de filtration sur gel,

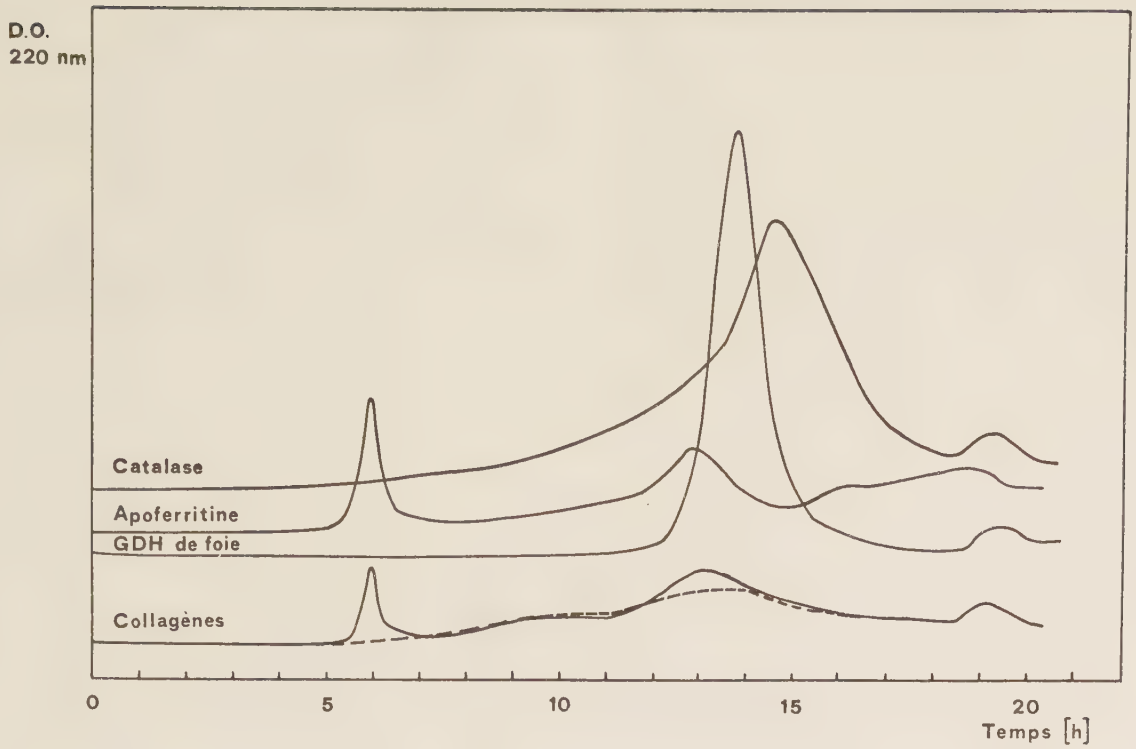


Figure 9 : Chromatographie sur Sepharose 4B (conditions : voir sous méthodes)

---- collagène de peau

—— collagène de veine saphène

entre protéines globulaires et fibrillaires, pouvait se faire sans restriction, le poids moléculaire du collagène de veine se siturait entre 270 000(catalase) et 336 000(GDH). Une détermination plus exacte de la valeur du poids moléculaire n'est pas possible, car la relation entre le log du PM et le volume d'élution n'est pas linéaire pour nos protéines de référence (36).

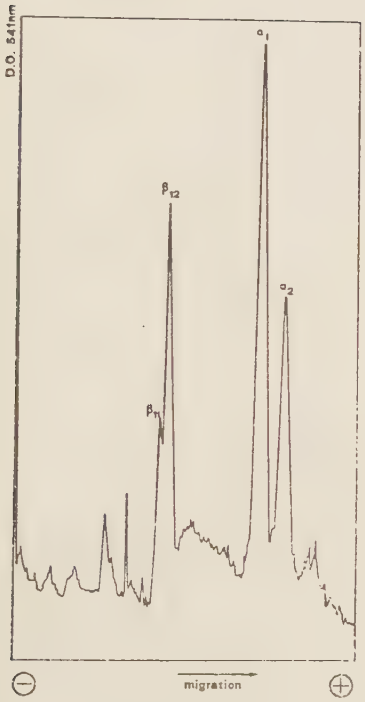
- Enfin les protéines de référence ne sont pas des glycoprotéines, à l'inverse du collagène de veine où la teneur en hydrates de carbone est de l'ordre de 2% (cf. chap.3.4.2). C'est peut-être pour cette dernière raison que le poids moléculaire apparent du collagène procède d'un pic dont la position est proche de celui de la GDH de foie (336 000). Outre le fait qu'une protéine fibrillaire, donc asymétrique, pénètre plus difficilement à l'intérieur des particules d'agarose, les glycoprotéines ont un volume spécifique partiel plus grand que les protéines non glycosylées.

3.2.2 "Disc-électrophorèse" sur gel de polyacralamide en présence de SDS

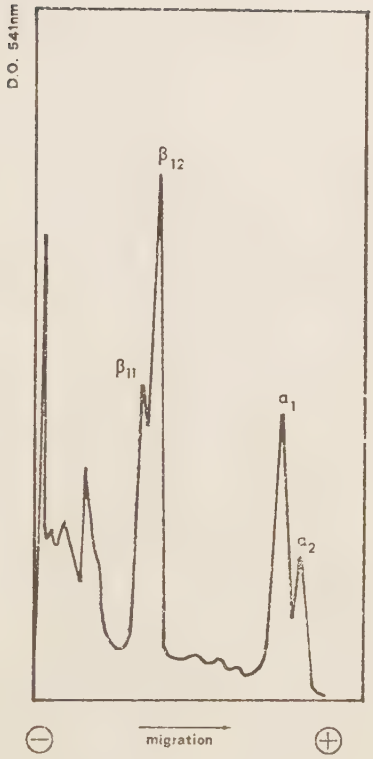
Il est généralement admis que la conformation native des protéines est détruite lors de l'électrophorèse en présence de SDS. Les macromolécules ainsi dénaturées ont une charge native due aux molécules de SDS qui leur sont liées dans un rapport stoechiométrique défini, et un comportement hydrodynamique variant uniquement suivant leur poids moléculaire. Ainsi la mobilité électrophorétique des chaînes polypeptidiques ne devrait dépendre que de leur taille (en réalité du nombre de leurs a.a.), rendant cette méthode simple et efficace pour une estimation des poids moléculaires.

3.2.2.1 Matériel et méthodes

La technique utilisées est celle décrite par Weber et Osborn (37) à laquelle de légères modifications ont été apportées. Les gels sont préparés dans un tampon phosphate 0.2M



a)



b)

Figure 10: Relevés densitométriques d'une migration électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS

a) de collagène soluble de veine de veau

b) de collagène soluble de peau de veau

à pH 7.0 contenant 0.2% de SDS. Les réservoirs des cuves sont remplis par le même tampon, mais dilué de moitié, et la concentration des gels en acrylamide est de 4%. Les échantillons sont préparés dans un tampon phosphate de Na 0.01M à pH 7.0 contenant 0.1% de SDS et 0.1% de 2-mercaptoéthanol, dialysées contre un grand excès du même tampon, puis incubé à 100°C durant 3 à 4 minutes, juste avant l'électrophorèse, qui dure 6 heures environ, si le courant est maintenu constant à 8mA/tube. Le bleu de bromophénol est utilisé comme indicateur de migration et la coloration des échatiollons est obtenus par le Coomassie Blue R-250. L'excès de colorant est ensuite lavé par l'acide acétique 7%. Les diagrammes colorimétriques sont enregistrés à 541 nm sur un appareil Perkin-Elmer-Gilcon.

3.2.2.2 Résultats et discussion

Contrairement à la grande majorité des protéines, le poids moléculaire du collagène et de ses sous-unités n'a pas pu être déterminé en se référant à d'autres protéines d'étalonage, telles que la BSA (67 000), la chaîne H de la γ-globuline (50 000) et de l'ovalbumine (45 000). Par contre, une comparaison avec le collagène soluble de peau de veau (Worthington), traité de façon semblable, révéla une migration quasi identique des différentes chaînes du collagène(cf. Fig.10).

Ce résultat nous permet d'égaler le poids moléculaire des différentes chaînes du collagène sòluble de veine et celui des chaînes homologues provenant de peau de veau: 93 000 à 98 000 pour la chaîne α1; le double et le triple pour les unités β et γ respectivement (2).

La raison principale du comportement différent du collagène lorsqu'il migre dans le gel de polyacrylamide-SDS semble être due à l'existence d'une semi-rigidité de sa conformation moléculaire dans son état dénaturé. Il a été démontré que cette restriction de la flexibilité à l'état "random coil", imposée par les résidus imino acides qui composent de 20% environ de la teneur totale en a.a. du collagène, confère une structure plus rigide à la molécule, qui migre ainsi plus

lentement que la plupart des protéines globulaires de référence et possède une viscosité accrue (38).

Toute comparaison de poids moléculaire, selon la méthode décrite, n'est possible qu'avec des échantillons étalons ayant une conformation moléculaire semblable ou identique, dans notre cas, à des collagènes d'autres sources et de poids moléculaire connu.

3.2.3 Vitesse de sédimentation

Dans un système à un seul composant macromoléculaire, le transport des macromolécules, soumis à un champ gravitationnel élevé, donne naissance à deux régions distinctes dans la cellule : l'une où le solvant est seul présent, l'autre où la concentration du soluté est uniforme. Entre ces deux zones existe une région appelée interface, où la concentration du soluté varie en fonction de la distance de l'axe de rotation, si la vitesse giratoire est constante. Comme le déplacement de l'interface est une mesure du mouvement des molécules du soluté, la méthode de la vitesse de sédimentation permet une étude du transport des macromolécules et fournit un paramètre physique pour le décrire, le coefficient de sédimentation. C'est en réalité une mesure de la vitesse de sédimentation des molécules passant à travers une surface unitaire (1 cm^2). Ce coefficient dépend de la taille et de la forme des dites molécules, plus exactement de leur asymétrie, jouant sur le coefficient de friction en loi de Stokes. La méthode utilisée pour la détection est celle de l'indice de réfraction. Les équations suivantes décrivent ce phénomène et permettent la détermination de s. Cette valeur est extrapolée à force ionique zéro, en solvant eau, à 20°C ($s_{\omega,20}$). La migration de l'interface dans la solution est déterminée, par rapport au centre de rotation, par le second moment de la variation linéaire de la concentration. Il est fait usage, à cet effet, d'une intégration entre les limites solvant pur et concentration uniforme de la macromolécule en aval de l'interface.

$$\bar{x}^2 = \frac{\int_{x_m}^{x_p} x^2 \frac{dc}{dx}\, dx}{\int_{x_m}^{x_p} \frac{dc}{dx}\, dx}$$

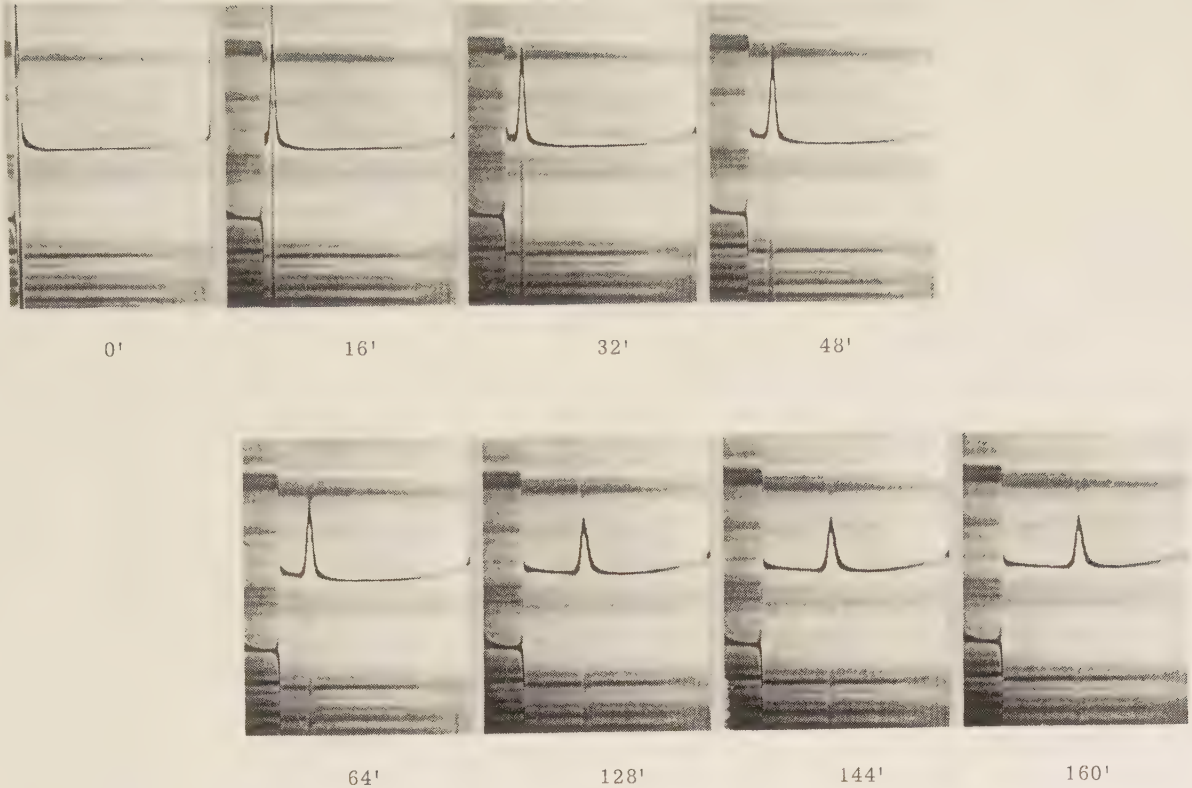


Figure 11 Vitesse de sédimentation du collagène soluble de veine saphène de veau. (conditions : voir sous méthodes) Le temps d'exposition des clichés est de 10 sec. à intervalle de 16 minutes.

où : $\bar{x}$ = distance de l'axe de rotation à l'interface (cm)

x = rayon de rotation

c = concentration du soluté

x_p = distance de l'axe de rotation à la région de concentration uniforme du soluté

x_m = distance du ménisque à l'axe de rotation

ou alors :

$$s = \frac{1}{\omega^2} d\left(\frac{\ln\bar{x}}{dt}\right)$$

où : ω = vitesse de rotation angulaire du rotor (radians·sec^{-1})

s = coefficient de sédimentation exprimé en S(Svedberg).

3.2.3.1 Matériel et méthodes

L'ultracentrifugeuse analytique Spinco Moldel E (Beckman) équipée du dispositif Schlieren (angle de fente à 60°) a permis la détermination du coefficient de sédimentation du collagène de veine dissous dans l'acide acétique 0.5M. Les mesures ont été faites à 20°C et à l'aide du rotor An-E tournant à 48 000 tours/min. Le temps d'exposition des photographies est de 10 secondes à intervalle de 16 ou 32 minutes dès que la vitesse nominale a été atteinte. La position des pics sur chaque cliché a été mesurée à l'aide d'un microcomparateur Nikkon.

3.2.3.2 Résultats et discussion

L'estimation du poids moléculaire est possible grâce à la formule suivante :

$$S = PM \cdot (1 - \bar{v}\rho) \cdot \frac{D}{RT}$$

où : $\bar{v}$ = volume spécifique partiel (cm^3/g)
0,705 (40) ou 0,706 (41) (déterminés)

ρ = densité du solvant (g/cm^3) 1,0025

D = coefficient de diffusion ($cm^2/sec \cdot 10^{-7}$)
1,35 ou 1,28 (5)

R = constante universelle des gaz ($8,315 \cdot 10^7$ erg·degré$^{-1}$·mole^{-1})

T = température absolue (^oK) 253

où D et $\bar{v}$ doivent être, ou mesurés séparément, ou calculés par comparaison avec des protéines standard.

Trois essais effectués dans des conditions identiques ont fourni les résultats suivants :

$S_{20,w} \cdot 10^{13}$	PM
4,4	279 000
5,0	318 000
4,5	286 000

Ces valeurs du coefficient de sédimentation correspondent assez bien avec celles d'autres collagènes, quoiqu'un peu élevées; néanmoins le PM calculé est très proche de celui estimé par les méthodes déjà décrites. Le tableau V énumère les valeurs des coefficients de sédimentation de collagènes de sources diverses.

T A B L E A U V

Source du collagène	$S_{20,w}$	Référence
tendon de queue de rat		
α1	3,16	(40)
α2	3,08	(40)
β12	4,28	(40)
membrane glomérulaire	4,00	(5)
membrane de Descemet	4,10	(5)
peau humaine α	3,00	(2)
β	4,00	(2)
invertébré (homard)	3,40	(42)
muscle cardiaque (boeuf)	3,13	(43)
veine saphène (veau)	4,45	

3.3 Microscopie électronique

La structure particulière de la molécule de collagène rend particulièrement aisée et attractive l'étude de son organisation fibrillaire à l'aide d'un microscope électronique. Ainsi, suivant le mode de fibrillation, il est possible de déterminer la périodicité des striations ou la longueur totale de la molécule de tropocollagène pour détecter soit une modification de l'enti-

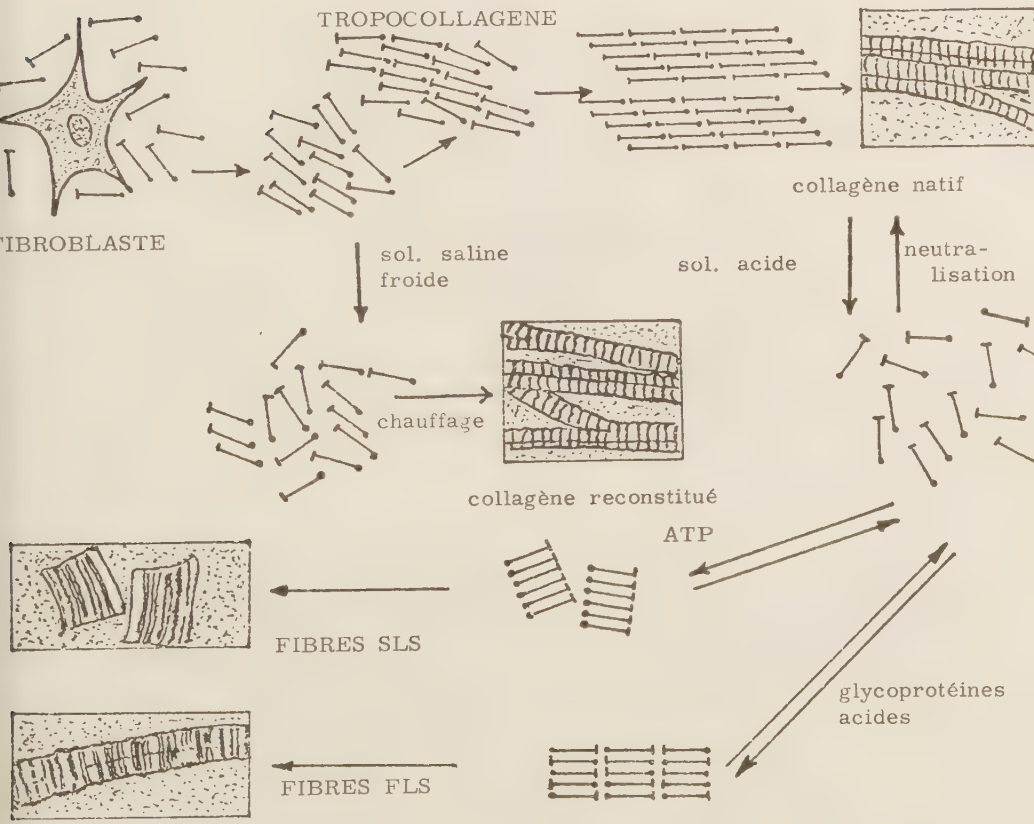


Figure 12: Représentation scématique des différentes possibilités de refibrillation du collagène et leurs images vues sous le microscope électronique.

té moléculaire, soit l'emplacement plus ou moins exact de certains fragments peptidiques, tels par exemple les peptides obtenus par clivage au bromure de cyanogène.

3.3.1 Matériel et méthodes

Le microscope JEM-T7 Jeol a servi pour toutes les observations des différentes préparations et l'agrandissement nominal a été de 30 000 . Les fibres de collagène natif ont été transferrées sur une grille recouverte d'un film de collodion-carbone et ont été fixées par l'acide phosphotungstique, suivant la méthode classique dite de "negative staining" décrite par Huxley et Zubay (44). Les fibres de collagène SLS ont été préparées par dialyse d'une solution acide de collagène contre une solution contenant 0,4 % d'ATP, pH 2,8 et observées au microscope électronique après une double fixation (21):
1) par l'acide phosphotungstique (0.4%) durant 12 à 15 min.
2) par l'acétate d'uranyle (1%) pendant 10 min après de nombreux lavages à l'eau. Des molécules de catalase (Worthington), de dimension connue (80$\pm$ 2 A), et traitées parallèlement aux fibres de collagène, ont servi d'étalon pour la mesure des différentes longeurs des fibres.

3.3.2 Résultats et discussion

Toutes les photographies des préparations de fibres SLS démontrent qu'à aucun moment, la préparation de collagène n'a été clivée, car la moyenne des mesures de la longueur de la fibre de tropocollagène de veine de veau est de 2800$\pm$ 20A. Nous n'avons constaté aucune différence, ni de taille, ni de longueur, ni de périodicité des striations spécifiques à la double fixation, représentatives de l'alignement de régions riches en a.a. basiques et acides, entre les fibres préparées avant et après la purification du collagène par chromatographie sur CM cellulose.

Dans le cas des fibres de collagène à l'état natif, une alternance périodique de zones claires et sombres est visible

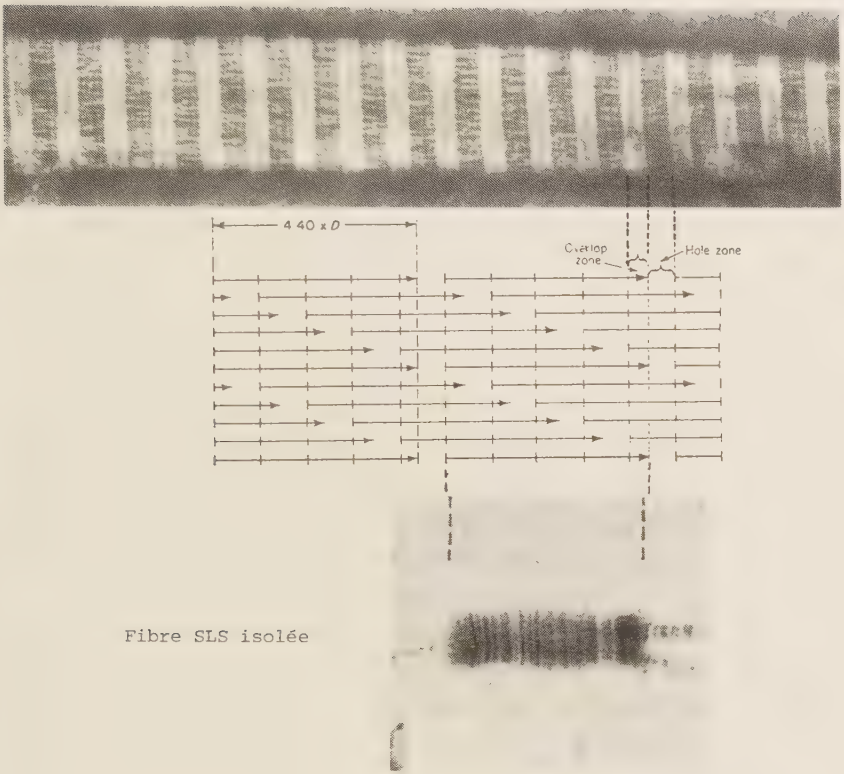


Figure 13: Photographies d'une fibre normale (negative staining) et d'une fibre SLS (double fixation) de collagène de veine, accompagnées d'une représentation schématique de l'arrangement moléculaire dans une fibre normale du même collagène. Agrandissement nominal 30 000 x)

Une période = 1 D = "hole zone" de 0,6 D + "overlap zone" de 0,4 D

1 D = 700 ± 30A

au microscope électronique après une fixation négative ("negative staining") (Fig.13). En réalité, cette alternance représente une variation de densité électronique qui provient de l'alignement particulier des molécules de tropocollagène. Chaque molécule est décalée axialement par rapport à sa voisine de 0,6D, où D est l'unité de période. Cette translation donne ainsi naissance à des régions de densité électronique plus faible, dénommée "hole zone". La longeur de la molécule doit de ce fait être un multiple non entier de D. D'après les mesures effectuées sur les fibres SLS, cette valeur se situe entre 4 et 5, plus exactement elle correspond à 4,4. L'unité de translation axiale de la macromolécule, non visible sur les micrographes, est ainsi de 5 D. Pour les fibres de collagène de veine, D équivaut à 700 $\pm$ 30A et partant, la longueur totale de la molécule de tropocollagène est de 3080 $\pm$ 130A (4,4 D). Cette valeur est plus précise que celle déterminée par les mesures de la longueur des fibres SLS, ces dernières ayant leurs extrémités terminales légèrement superposées. En outre, elle est tout à fait comparable à la valeur obtenue en sommant les longueurs des peptides dérivés par clivage au CNBr et qui est de 2990A pour le collagène du tendon de queue de rat (35).

3.4 Teneur et composition en hydrates de carbone

Bien qu'il soit connu depuis quelque temps déjà que des hydrates de carbone sont associés aux différents collagènes (45,46,47), ce n'est que durant ces dernières années qu'il a été fermement établi que le collagène fait partie des glycoprotéines. Le collagène fibrillaire des vertébrés semble ne contenir qu'un faible pourcentage d'hydrates de carbone, moins de 2% en général, tandis que les collagènes des invertébrés et les protéines de la "famille" des collagènes, telles les membranes basales, peuvent en contenir jusqu'à 15% de leur poids (46).

La séparation de ces collagènes des autres polymères riches en hydrates de carbone rend parfois délicat l'établissement des relations exactes qui existent entre les protéines isolées et les groupements saccharidiques, ces derniers étant supposés jouer un rôle important dans l'établissement des cross-links et à la formation de la triple hélice.

3.4.1 Matériel et méthodes

La réaction colorimétrique phénol-acide sulfurique décrite par Dubois (48) a servi à la détection et au dosage total des hydrates de carbone. L'identification des hexoses et des pentoses, sous forme d'acétate d'alditols, a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse, sur un appareil Perkin-Elmer 900. Les conditions décrites par Lehnhardt et Winzler (49), aussi bien pour les conditions d'hydrolyse et de préparation des dérivés que pour l'analyse des monosaccharides neutres, furent appliquées, à de très légères différences près. Une deuxième méthode (50,51), semblable à la première (49), a permis la vérification des résultats déjà obtenus.

Tous les réactifs utilisés, sauf le borohydrure de Na, étaient de pureté analytique. La pyridine est chauffée à reflux durant 1 heure avec de la ninhydrine, puis distillée et conservée sur KOH jusqu'à emploi. L'utilisation d'un monosaccharide externe de référence, (2-déoxyglucose ou

arabinose) a permis de corriger les erreurs dues aux pertes lors des manipulations. Les standards d'acétates d'alditols ont été fournis par Regis Chemical Co, Milwaukee.

La chromatographie sur couche mince des sucres libres, puis leur coloration par le nitrate d'Ag, ont été décrites par Trevelyan (52). La détection et le dosage des acides uroniques, ainsi que des pentoses, ont été effectués d'après la méthode de Wardi (53), et la détermination de l'acide sialique selon la méthode de Skoza et Mohos (54).

La réaction de β-élimination et l'addition subséquente de bisulfite, qui permettent de mettre en évidence les résidus Ser et Thr O-glycosylés, ont été conduites selon les indications de Spiro (55) et de Simpson (56). Dans notre cas, l'addition d'urée jusqu'à une concentration finale de 2M a été judicieuse, ainsi que le recours à la méthode décrite par Downs et Pigman (57) pour la réaction alcaline de β-élimination. Le bisulfite et le sulfite radioactifs (^{35}S) d'activité spécifique d'environ 10 mCi/mmole, provenaient de Radiochemical Center Ldt, Amersham (England).

Les sucres aminés, GlcN et GalN, ont été dosés après hydrolyse du collagène dans HCl 4N durant 3h à 100°C et passage sur une colonne de résine Beckman PA-35 (cf.Chap.3.1.1.) calibrée au moyen d'une solution de référence.

3.4.1.1 Isolement de Gal-Hyl et Glc-Gal-Hyl

Les groupements saccharidiques des collagènes sont le galactosyle et le glucosylgalactosyle, liés à l'hydroxylysine l'un et l'autre. Nous avone dû les isoler et les purifier au préalable.

La méthode utilisée, et partiellement décrite par Smith(58), fait intervenir la propriété de la liaison O-glycosidique Gal-Hyl d'être une liaison "alcali-résistante". Une hydrolyse alcaline d'environ 50g d'éponge marine, matériel riche en saccharides de ce type, permet de séparer par chromatographie d'échange d'ions et par filtration sur gel, une fraction riche en Glc-Gal-Hyl et en Gal-Hyl. Les hexoses liés sont non-

réducteurs, la liaison à l'a.a. se faisant par le C-anomérique. Par filtration sur une colonne de Biogel P-2, les fractions contenant les deux unités saccharidiques sont séparées et lyophilisées, avant d'être analysées par un Amino Acid Analyzer (cf.Chap.3.1.1). La contamination par des a.a. neutres, ainsi décelée, a incité à reprendre le purification, pour une étape consistant en une migration électrophorétique sur papier, aux conditions suivantes :

U = 2 000 V I = 30 mA Durée : 90 min

Tampon : pyridine/ac. acétique/eau, 100/4/896 à pH 6.5

Révélateur : sol. de ninhydrine stock diluée 3X dans l'acétone

Sol. stock : 400 mg Ninhydrine (Pierce)
90 ml isopropanol
10 ml H_2O
2 ml 2,4,6 collidine

Support : papier Whatman No 1 et No 3

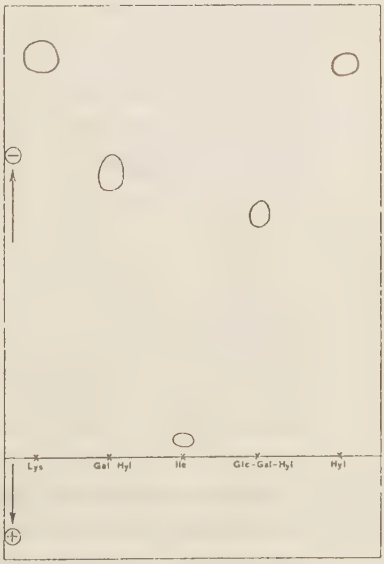


Figure 14: Electrophorèse haute-tension sur papier de Gal-Hyl et de Glc-Gal-Hyl. Les a.a. basiques servent de référence.

La liaison glycosidique entre Glc et Gal étant labile en milieu acide, il a été possible de vérifier la diminution quantitative de la concentration de Glc-Gal-Hyl et l'augmentation de celle de Gal-Hyl après hydrolyse de 24h à 100°C dans H_2SO_4 0.1N.

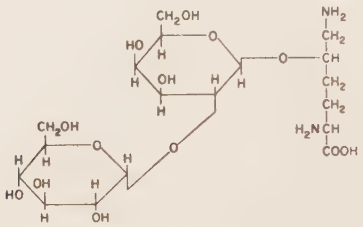


Figure 15: Structure de 2-O-α-D-glucopyranosyle-O-β-D-galactopyranosylhydroxylysine. (Glc-Gal-Hyl)

Toutes ces analyses, ainsi que les rapports molaires Hyl/Gal et Glc/Gal, font conclure à la pureté de nos échantillons et permettent de les utiliser comme références, en admettant que l'aire du pic d'élution correspondant à 0.1 µmole en chacun des deux composants, est équivalent à 0.1 µmole de Hyl. Ces analyses permettent aussi la détermination du nombre des hydroxylysines libres et glycosylées dans les collagènes.

Avant la dernière étape de purification, l'isolement partiel de Glc-Gal-Hyl du collagène de veine a été opéré selon la méthode de Spiro (59,60) avec la modification suivante : l'hydroxylysine libre ou substituée furent séparées de la majeure partie des peptides et autres a.a. par une filtration sur gel (Sephadex G-15-120 ou Biogel P-2), avant d'être complètement purifiées par électrophorèse. Les bandes de papier contenant les unités saccharidiques sont découpées, puis éluées au moyen de HCl 10^{-3}N, la solution étant ensuite concen-

trée sous pression réduite avant d'être analysée par l'Amino Acid Analyzer.

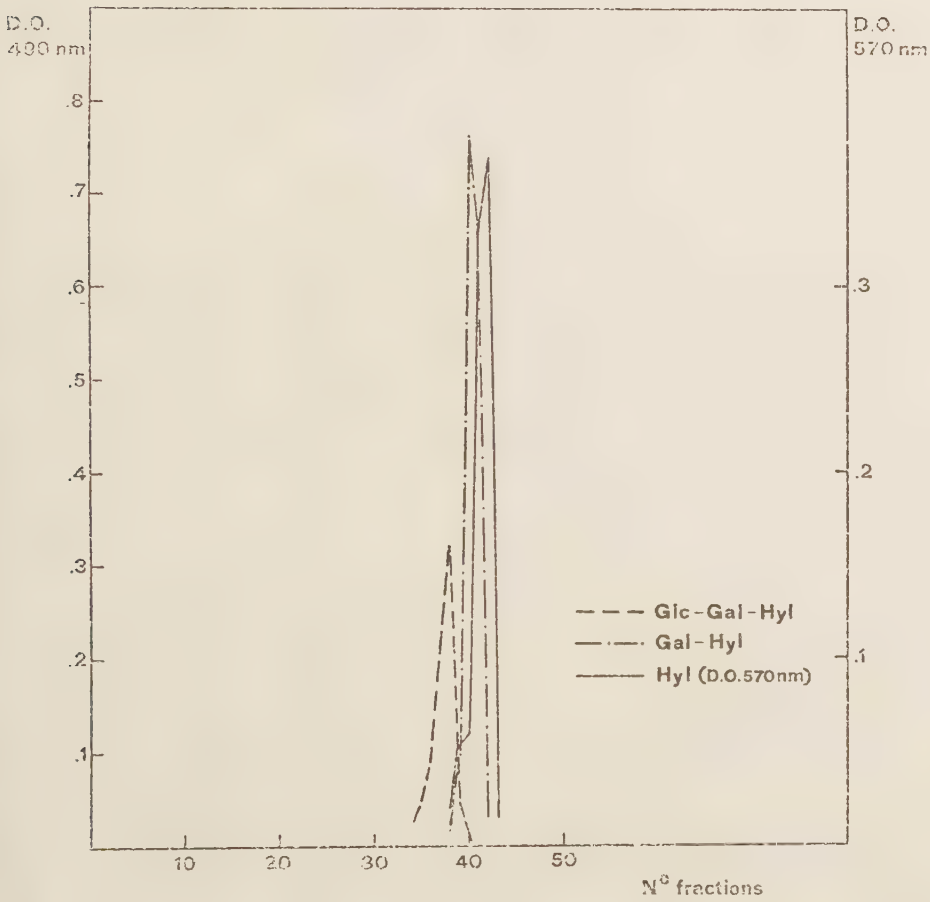
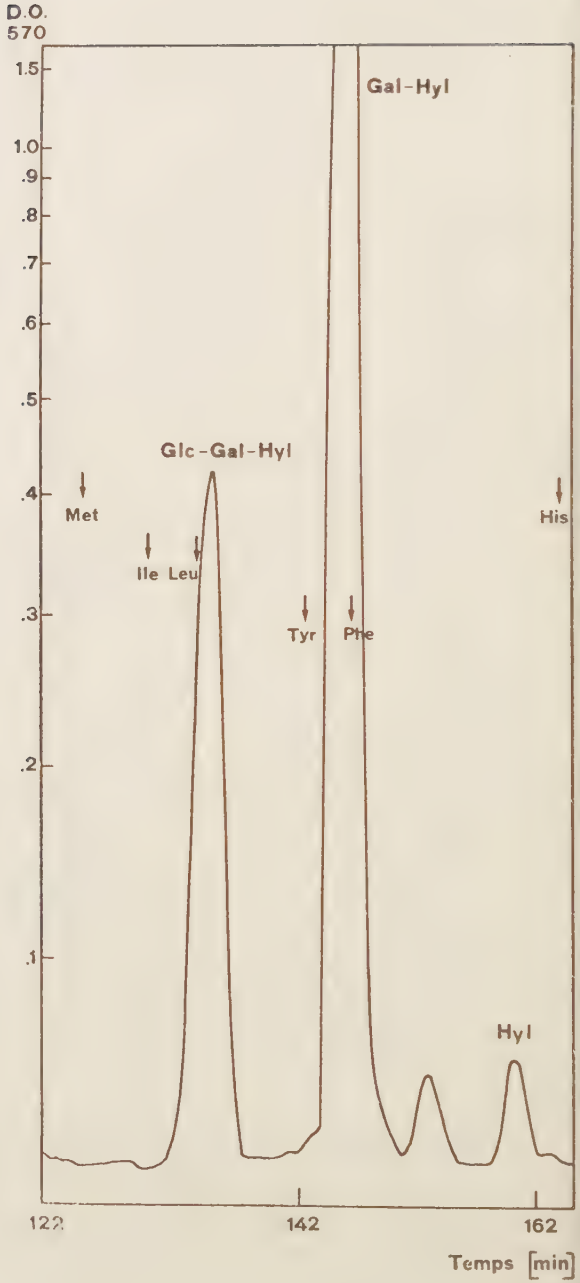


Figure 16: Chromatographie sur Sephadex G-15-120 des produits d'hydrolyses isolés à partir d'éponges marines.



igure 17 : Diagramme d'élution de Gal-Hyl et de Glc-Gal-Hyl de la résine Beckman AA-15 (voir cond. exp. chap. 3.4.1.1)

es flèches indiquent la position es a.a. correspondants lors 'analyses dans les conditions tandards.

3.4.2 Résultats et discussion

Un premier essai de dosage des hexoses et des pentoses dans les différents extraits de collagène de veine a permis de contrôler l'efficacité des étapes finales de purification, notamment la décontamination des protéoglycans.

D'autre part, la teneur élevée en hydrates de carbone, de 2-3%, pour un collagène de vertébré de type I, a surpris, ce qui nous a incité à identifier, puis à doser, chaque groupe de monosaccharides. Le tableau VI résume les résultats ainsi obtenus.

TABLEAU VI

Fractions+	Xyl*	Man*	Gal*	Glc*	UN/1000a.a.**
H	10,8	5,3	7,1	4,8	5,2
I	2,1	1,2	4,8	2,9	2,1
I(2)	7,2	12,0	2,0	6,4	5,0
J	3,8	1,1	3,3	1,9	1,9
α1	1,6	1,6	4,4	3,2	2,0
α2	1,2	0,8	4,8	1,2	1,5
(2α1)α2	1,5	1,3	4,5	2,5	1,8

\+ La dénomination des fractions correspond à celle décrite au chapitre 2.2.2

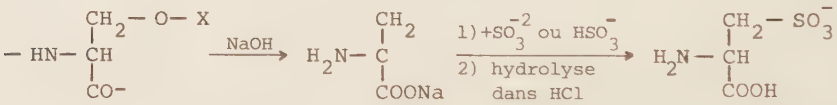
* La concentration est rapportée à 1000 a.a.

** La teneur totale en unités saccharidiques (UN) est indiquée en % (pds/pds) hydrates de carbone/1000 a.a.

Il est à remarquer, et c'est un fait généralement bien établi, qu'un dosage de saccharides ne donne pas des nombres entiers par a.a., non seulement pour raison d'erreur de dosage, mais parce que les taux de glycosylation dans la fibre native varient selon le tissu, l'activité physiologique du conjonctif et l'âge.

Le résultat le plus surprenant est la présence de xylose et de mannose. Pour vérifier si le pic d'acétate de xylitol détecté par GC est réellement du xylose (Fig.18 et 20), nous avons procédé à plusieurs vérifications : chromatographie en couche mince des monosaccharides libres obtenus après hydrolyse du collagène (Fig.19), et une série de réactions de β-élimination. L'hypothèse d'une contamination en hydrates de carbone par les membranes à dialyse est à exclure, car un essai à blanc effectué dans les conditions semblables a révélé que 1-2% au plus du Glc et du Xyl pouvaient être imputés à la membrane à dialyse utilisée.

Si une glycoprotéine, contenant des unités saccharidiques liées par des liaisons O-glycosidiques aux acides α-amino β-hydroxylés (Ser, Thr), est traitée en milieu alcalin, la liaison glycosidique est rompue par la réaction de β-élimination. Cette réaction libère un ou plusieurs oligosaccharides d'une part, et une chaîne peptidique d'autre part, celle-ci contenant soit une déhydroalanine, soit l'acide 2-amino-buténoïque, qui peuvent ensuite être convertis en dérivés sulfonylés par addition de sulfite ou de bisulfite.



Ser substituée — ac. 2-amino-acrylique — ac. cystéique

Schéma de la réaction de β-élimination

Le xylose étant spécifiquement lié à la Ser, il nous a paru intéressant d'effectuer cette expérience et de détecter soit la diminution du nombre de résidus Ser, soit la présence de l'acide cystéique dans l'hydrolysat total du collagène ainsi transformé. Cette expérience s'est révélée fructueuse, puisque l'ac. cystéique apparait conjointement à une diminution du nombre des résidus Ser. Les estimations ainsi effectuées indiquent

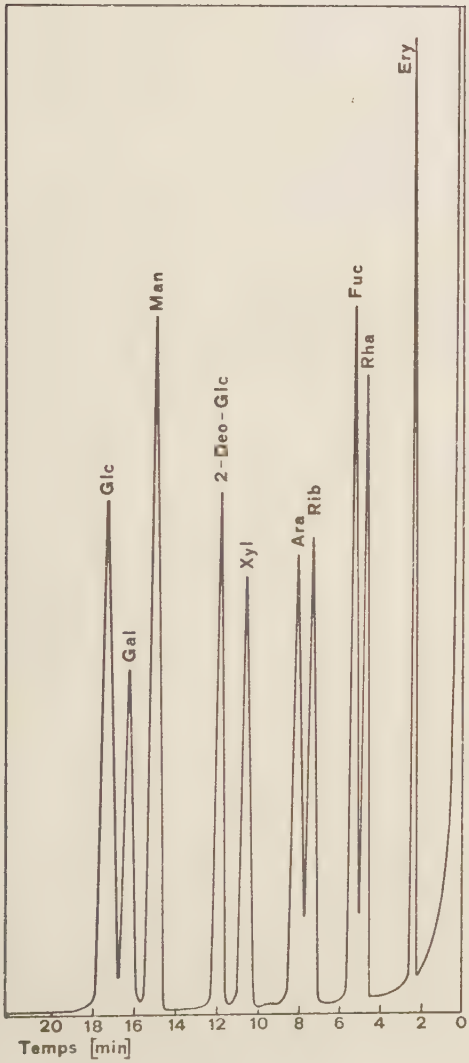


Figure 18: Séparation par GC des acétates d'alditols de monosaccharides de référence.

Conditions :

Colonnes de 3% de ECNSS-M sur Gas-Chrom Q de 100/120 mesh
Dimensions : 0.3 x 120 cm
Temp. initiale : 170 °C
Temp. finale : 190 °C
Programme de temp : 8' à 170 °C puis 5 °/min et enfin 10' à 190 °C
Temp. de l'injecteur : 200 °C
Temp. du détecteur (ionisation de flamme) : 250 °C
Débit N_2 : 35 ml/min
Débit H_2 : env. 40 ml/min

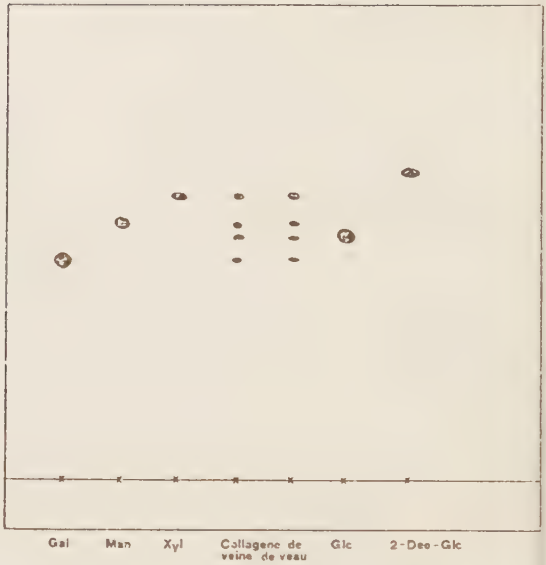


Figure 19 : TLC des pentoses et hexoses libres du collagène de veine (conditions : voir sous méthodes)

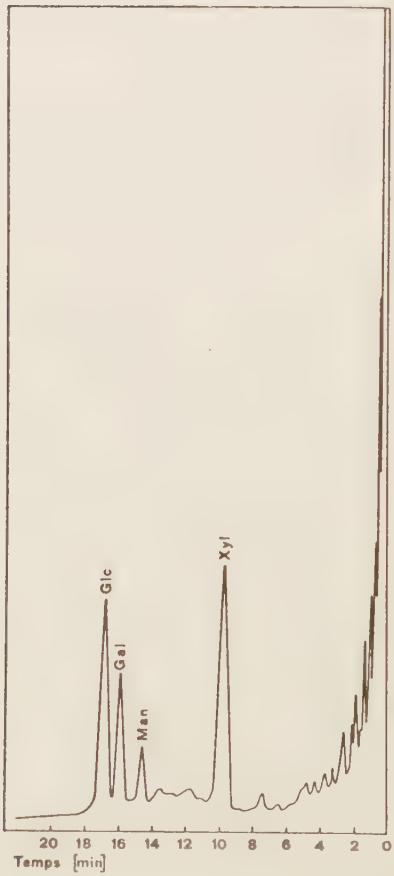


Figure 20 : Séparation par GC des acétates d'alditols des pentoses et des hexoses du collagène soluble de veine saphène de veau

que 4 résidus Ser sur 1000 sont transformés en résidus déhydroalanines, donc initialement substitués par du xylose. Néanmoins, un doute subsiste du fait que le Xyl peut provenir d'une contamination à haute affinité pour le collagène, et qui est pratiquement impossible à éliminer, malgré tous les traitements dissociatifs appliqués. La même expérience de β-élimination a été répétée, mais en utilisant du sulfite radioactif ($^{35}SO_3^-$). L'hydrolyse acide a été supprimée et remplacée par une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide-SDS.Après la détection colorimétrique des protéines, le gel est placé en contact avec un film radiosensible pour les émissions produites par ^{35}S. Nous avons ensuite comparé les résultats des deux expériences. Malheureusement, la molécule de collagène n'a pas résisté entièrement au traitement alcalin et la population hétérogène de protéines détectées, contenant de l'acide cystéique radioactif, était fragmentée. Cependant, la détection du xylose sur des chaînes α1 et α2 intactes, préparées dans des conditions dénaturantes à 50°C durant 1h dans un tampon contenant 6M urée, puis fractionnées sur une colonne de CM-cellulose à 45°C, en tampon contenant de l'urée 1M, a confirmé clairement la présence de xylose. Cette identification de xylose a entraîné celle d'autres hydrates de carbone généralement liés à ce dernier; les résultats de ces investigations sont résumés au tableau VII.

TABLEAU VII

	% HC/collagène	Nb de résidus/1000a.a.
GlcN	0,30	1,50
GalN	----	----
Ac. hexuroniques	0,25	1,20
Ac. sialiques	0,16	0,48

Les résultats du tableau VII proviennent de l'analyse de la fraction I (cf chap. 2.2.2)

Nous avons aussi déterminé le nombre et les caractéristiques des unités saccharidiques liées aux résidus Hyl, suivant les méthodes décrites au chapitre 3.4.1.1. Ces résidus, généralement situés vers la partie N-terminale des chaînes α, semblent assumer une fonction primordiale de repère et de stabilisation dans la formation de la triple hélice (81).

Le rapport Gal-Hyl/Glc-Gal-Hyl et le % de glycosylation varie assez fortement d'un tissu à l'autre, même chez les vertébrés. Aucune explication valable, mis à part une séquence plus ou moins bien définie dans la région incriminée, ne peut être avancée pour cette hétérogénéité (60,82,83). Pour le collagène soluble de veine, nous avons trouvé les résultats indiqués au tableau VIII et qui sont, fait intéressant à noter, en accord avec ceux obtenus par Henkel (29) qui a partiellement caractérisé le collagène de type I de l'aorte de veau, mais après un long traitement alcalin du tissu conjonctif.

TABLEAU VIII

	Hyl total*	Gal-Hyl*	Glc-Gal-Hyl*	Hyl non substitué
collagène de veine de veau	6	0,8	1,7	51%

* Nombre de résidus pour 1000 a.a.

La présence de xylose et de mannose appelle une discussion plus détaillée de ce point important. Si le mannose a été souvent mentionné en tant que contaminant ou partie intégrante d'autres collagènes (60,61,62,63), il n'en va pas de même du xylose, qui n'a été détecté qu'une seule fois constitutif du tropocollagène, dans un extrait du conjonctif de la cornée oculaire (62,64,18). En plus des sucres déjà cités, les collaborateurs du Salk-Institute qui ont étudié ce collagène particulier, ont démontré la présence de GalN et de Fuc, unités saccharidiques qu'ils consi-

dèrent comme constitutives de ce collagène.

Nos résultats ont été totalement reproductifs sur une dizaine d'analyses effectuées en double essai. Ils sont confirmés par l'application de techniques différentes: hydrolyse des chaînes saccharidiques opérée en accord avec les conditions prescrites pour éviter des dégradations autres que les hydrolyses glycosidiques et peptidiques (49), méthode confirmée par de multiples hydrolyses ménagées des hydrates de carbone de glycoprotéines. L'identification chromatographique des sucres non-aminés,après dérivatisation, a été vérifiée qualitativement et quantitativement par surcharge au moyen de standards analytiques correspondants.

La réalité de la liaison covalente directe Xyl-Ser et d'un rapport stoechiométrique 1 à 1 entre ces deux composants a été établie par β-élimination, sur la molécule de tropocollagène et les chaînes isolées.

L'analyse totale des a.a. du collagène a confirmé la diminution équivalente du nombre de résidus Ser après β-élimination. En outre, une exacte corrélation a été établie entre la diminution du nombre des résidus Ser ainsi modifiés chimiquement et le dosage indépendant des résidus hexoses après hydrolyse directe des composants saccharidiques du collagène initial.

La présence des mêmes sucres s'est révélée constante pour les chaînes α1 et α2 après leur séparation complète par dissociation de la triple hélice, consécutive à une dénaturation thermique, suivie d'une chromatographie en urée 1M. Ces procédés sont conformes aux conditions dissociatives et dénaturantes usuellement appliquées en chimie des protéines.

Le mannose, qui n'est pas lié en O-glycoside à un amino acide chez les vertébrés,(un cas seulement connu chez les invertébrés, dans un collagène d'Annélide), a été reconnu très récemment comme un constituant de la partie glycosidique covalente du précurseur procollagène (94) et les auteurs qui rapportent cette découverte postulent un transfert glycosidique aux peptides d'extension du collagène lui-même, après clivage intracellulaire au niveau des cisternae du réticulum endoplasmique. Le fait que nous ayons obtenu, par la méthode de solubilisation mise au point

dans ce travail, des tropocollagènes intégralement pourvus de "peptides d'extension" de longueur maximale, à des conditions physico-chimiques non comparables avec celles des auteurs précités, autorise à penser que le mannose est constitutif du collagène élaboré par les fibroblastes de veine. Bornstein et ses collaborateurs ont également démontré la nécessité d'une glycosylation du procollagène pour l'activation de la procollagène-peptidase C-terminale (80).

La proportion remarquablement élevée de xylose dans toutes les préparations de tropocollagènes et les chaînes séparées, qui se situe entre les valeurs représentant la somme des résidus Glc + Gal et la valeur individuelle du Gal, sucres constitutifs par excellence de tous les collagènes, impose l'idée que le Xyl serait associé à ces tropocollagènes de manière permanente, comme les sucres constitutifs, plutôt qu'en qualité de contaminant. Sachant que chaque résidu xylosyle est ici lié à un amino acide Ser - en conformité d'ailleurs avec les voies métaboliques de la glycosylation qui font intervenir l'UDP-xylosyle-transférase en première étape de la biosynthèse des chaînes saccharidiques et comme unique résidu de son espèce dans ces structures - l'hypothèse d'une contamination par l'un des protéoglycans ou l'une des glycoprotéines A et B (96), connues pour intervenir dans la fibrillogenèse du collagène, est difficilement soutenable.

Les arguments qui militent pour une contamination doivent cependant être examinés à la lumière de tous les faits expérimentaux rapportés ici. Depuis plus d'une décennie, de nombreux auteurs ont pris argument de la présence de diverses unités saccharidiques dans des préparations de collagène de diverses origines histologiques, ayant subi pour la plupart des traitements hydrolytiques partiels lors de leur extraction, pour proposer l'idée d'une interaction à haute affinité entre certains protéoglycans du conjonctif et les unités tropocollagène (65,66, 72,73,90). Ces interactions impliqueraient une corrélation quantitative entre le nombre d'unités tropocollagène d'une fibre, et partant son diamètre (68), et la quantité de ce protéoglycan sécrété simultanément par le fibroblaste. D'autres travaux

insistent sur le rôle possible de ces protéoglycans dans la mise en registre des tropocollagènes au stade préliminaire de la formation des microfibrilles. On sait par exemple que la nucléation du collagène fibrillaire est différée *in vitro* au pro rata de la quantité de certains protéoglycans ou glycoprotéines présents (84). L'ordonnance géométrique des unités tropocollagène est d'ailleurs dictée en partie par eux, singulièrement dans la formation des FLS (95). La nature exacte de ces composants n'est pas connue, malgré diverses suggestions apparues dans la littérature.

Appliqué à notre situation, l'examen des sucres cités plus haut, et leurs proportions relatives, font exclure d'emblée la grande majorité des protéoglycans,non compatibles avec l'absence de GalN et de Fuc (67,71). On sait d'autre part que le taux d'acide sialique n'est pas un critère quantitatif déterminant, en raison de sa labilité et du fait que les chaînes polysaccharidiques *in vivo* ne sont pas toujours complètes (69). Le seul candidat protéoglycan qui puisse intervenir ici serait l'héparane sulfate. On constate cependant que les rapports de composition des acides uroniques + GlcN, à savoir les unités disaccharidiques répétées, et le nombre de Xyl trouvé dans nos préparations, sont incompatibles avec les séquences connues pour l'héparane sulfate. Le Xyl y représente obligatoirement une fraction de GlcN ou acides uroniques, alors que nos analyses indiquent en moyenne pour 1000 a.a., 4 résidus Xyl pour 1,5GlcN et 1,5 acides uroniques. La répétition multiple, très vraisemblable, des unités disaccharidiques dans l'héparane sulfate exigerait que ces proportions soient inverses pour le moins.

L'hypothèse d'une contamination en protéoglycans exédant les valeurs mesurées en ac.uroniques, semble bien peu probable. S'agissant des glycoprotéines A ou B, le peu que l'on sache de leur constitution, dominante en a.a. et plus réduite en sucres totaux, de même que ce que l'on sait de leur solubilité, s'opposent à cette éventualité. Une cofibrillation collagène-glycoprotéine A ou B impliquerait une évidente modification de l'image de répartition des peptides de CNBr du collagène, après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Or rien de tel n'a été constaté et les profils d'électrophorèse sont absolument typiques des

des collagènes de types I et III.

S'agissant de la détection de glycopeptides sur gel de polyacrylamide par la méthode de PAS, nos résultats ont été négatifs dans tous les cas. Cette observation, apparemment surprenante puisque le collagène est en soi une glycoprotéine, est pourtant parfaitement conforme au fait que le PAS n'est positif qu'avec des oligo- ou des polysaccharides contenant de l'acide sialique. (communication personnelle du Prof. R. Jeanloz). Les glycopeptides procédant du collagène ne sont pas décelables. L'absence totale de réponse confirme que le niveau de contamination oligosaccharidique, s'il existe, se situe au-dessous de la limite de détection par ce procédé. Il n'est, de surcroît, pas vraisemblable qu'une macromolécule à composante protéique dominante, essentiellement ionique et polaire, puisse être retenue au terme de toutes les étapes de purification, resolubilisation et refibrillation effectuées dans ce travail, ou encore après dissociation et séparation chromatographique des chaînes α individuelles. (92) Certains auteurs affirment par ailleurs, que le maximum de protéoglycans ne peut être éliminé que si le collagène présent n'est pas dénaturé (70).

Sans pouvoir être absolument affirmatif sur cette question, nous pensons que le xylose et le mannose sont des hexoses constitutifs du tropocollagène acido-soluble de veine, tel que nous l'avons isolé. La présence d'hydrates de carbone supplémentaires, par rapport à ceux déjà répertoriés dans les collagènes vasculaires, pourrait s'expliquer par le fait que certaines régions, propices à la glycolsylation des résidus Ser, α1(I)CB7 par exemple (74,75), sont les sites d'attaches des fibronectines ou des protéines d'attachement cellulaire, CAP (76). En outre, cette même région paraît jouer un rôle certain lors de la différencition des myoblastes (77). Bien que certains travaux laissent croire que la région de contact entre le collagène et les CAP soit dépourvue d'hydrates de carbone (76), la région α1(I)CB5-CB4, lieu d'agrégation des plaquettes sanguines, est porteur du disaccharide Glc-Gal (79).

3.5 Analyse de la structure secondaire du collagène par dichroïsme circulaire.

Dans l'exercice de leurs activités biologiques, les protéines subissent des changements de conformation qui peuvent être décelés par des méthodes spectropolarimétriques, telles que l'ORD et le CD.

La lumière, une radiation électromagnétique caractérisée par sa longueur d'onde et son amplitude, consiste en un composant électrique et un composant magnétique, l'un perpendiculaire par rapport à l'autre. Le vecteur du champ électrique de la lumière monochromatique émise oscille dans tous les plans indifféremment, au contraire du faisceau qui a été polarisé planairement et qui n'oscille que dans un seul plan. La lumière polarisée peut être décomposée, mathématiquement parlant, en deux vecteurs polarisés circulairement, égaux en amplitude, mais opposés dans leur sens de rotation. Une substance ayant une transition électronique optiquement inactive va influencer de manière identique la vitesse de rotation des deux vecteurs, cependant qu'une substance optiquement active va retarder de façon inégale la vitesse de rotation de l'un des composants par rapport à l'autre,entraînant par la même, une rotation du plan de polarisation de la lumière transmise. Un enregistrement de la rotation du plan de polarisation de la lumière transmise, en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente, est un spectre de dispersion optique rotatoire (ORD).

Ce même milieu optiquement actif modifie aussi, de façon différente, l'absorbance de chacun des deux composants circulairement polarisés, cette situation résultant de la différence d'absorptivité des composants polarisés "gauche" et "droite". Le dichroïsme circulaire (CD) est la mesure expérimentale qui décrit ce phénomène et dont le spectre caractérise cette différence d'absorbance des différents composants "gauche" et "droite".

Les deux méthodes spectropolarimétriques, brièvement décrites, sont le reflet de la structure secondaire des protéines.

3.5.1 Partie expérimentale

Les enregistrements des spectres CD ont été exécutés avec un spectropolarimètre JASCO Modèle J-20, à température ambiante constante et sous un flux d'azote de 15 l/min pour le domaine des longeurs d'ondes situé au-dessous de 210 nm, et de 4l/min pour les longeurs d'ondes situées au-dessus de cette valeur. La concentration des solutions de collagène a été échelonnée entre 0.04 et 0,2 mg/ml dans un tampon citrate de Na 10 mM à pH 3.6. Les solutions ont été filtrées sur Millipore avant d'être introduites dans les cellules, et des enregistrements de ligne de base ont été effectués avant et après les solutions de collagène, toujours avec les mêmes cellules (chemin optique: 0,05 cm).

Le relevé des valeurs d'ellipticité a été effectué manuellement sur les enregistrements directs et, dans certains cas, par une estimation visuelle de la valeur moyenne.

Les valeurs d'ellipticité molaire ont été calculées à partir de l'expression suivante :

$$[\theta]_\lambda = \frac{\theta_{obs} \times PMR}{10 \times d \times c}$$

où : $[\theta]_\lambda$: ellipticité molaire ($deg \cdot cm^2 \cdot dmole^{-1}$) à une longeur d'onde déterminée

θ_{obs} : ellipticité observée (deg.)

PMR : poids moléculaire moyen d'un résidu

d : chemin optique (cm)

c : concentration du soluté (g/ml)

3.5.2 Résultats et discussion

Les collagènes diffèrent de la plupart des autres protéines par leur composition en acides aminés et par la structure de leur macromolécules. En particulier, tous les collagènes contiennent un pourcentage très élevé, 20% ou plus, en proline et hydroxyproline. La teneur élevée en Gly et en Ala est un des seuls points de comparaison avec les autres protéines fibreuses telles que les kératines et les fibroïnes. La conformation des collagènes a été étudiée par de nombreuses méthodes d'analyse (diffraction de rayons X, microscopie électronique, rotation optique, etc.)(86),il en ressort que la structure des molécules de tropocollagène est comparable à un cylindre semi-rigide, très asymétrique, d'une longeur d'environ 3000A et d'un diamètre de 15A. La molécule de tropocollagène est composée de 3 chaînes polypeptidiques,de conformation assez semblable à celle de l'hélice que forme la poly-L-proline II en solvant aqueux. Les hélices primaires sont gauches, de 3 a.a. par pas; elles s'enroulent en superhélice autour d'un axe commun de chiralité inverse à celle des 3 hélices primaires. Ces dernières diffèrent nettement des hélices α, non seulement par leur caractéristiques géométriques, mais aussi par des facteurs de stabilisation. Les liaisons hydrogène jouent un rôle moindre dans l'hélice composite collagène, à cause de la teneur élevée en Pro, au contraire des interactions de type hydrophobe qui semblent être des facteurs importants dans la stabilisation de la molécule de tropocollagène.

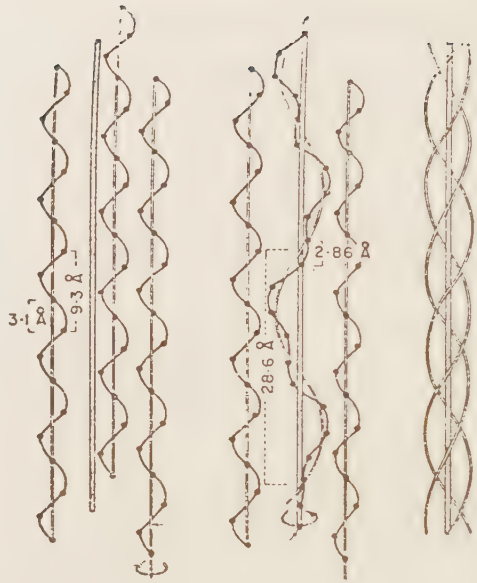
Les figures 21 et 22 montrent respectivement les spectres CD du collagène de veine saphène de veau et du modèle de comparaison poly-L-proline II, puis des différentes formes structurales fondamentales des chaînes polypeptidiques décrites par Greenfield et al (87).

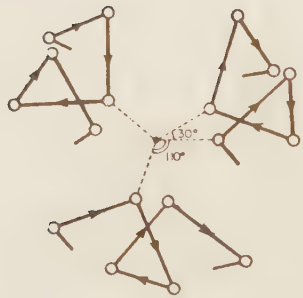
Le tableau IX indique l'amplitude maximale des bandes d'ellipticité des spectres CD du collagène de veine saphène de veau.

a)

9.3A = pas de l'hélice primaire (3 résidus a.a.)

28.6A= pas de la superhélice (9.23 résidus a.a.)





b)

Figure 23: a) représentation schématique de la structure des hélices "gauches" des chaînes polypeptidiques et de la molécule de tropocollagène, hélice droite. (91)

b) illustration schématique de la triple hélice en projection; les cercles représentent les carbones α et les lignes les joignant les groupes peptidiques.

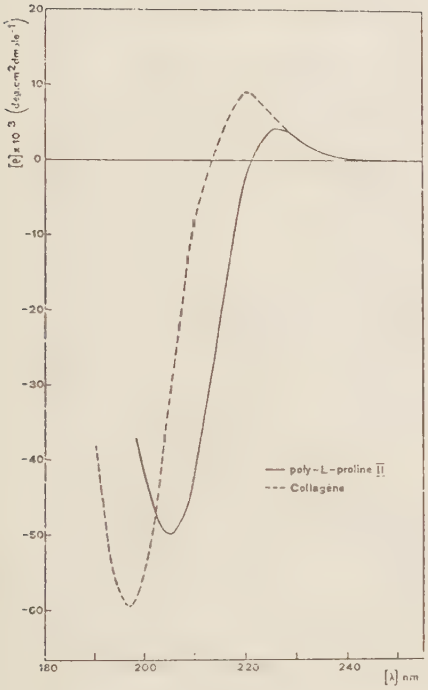


Figure 21: Spectre CD du collagène de veine de veau et du polymère poly-L-proline II (85). (Cf. conditions expérimentales au chapître 3.5.1)

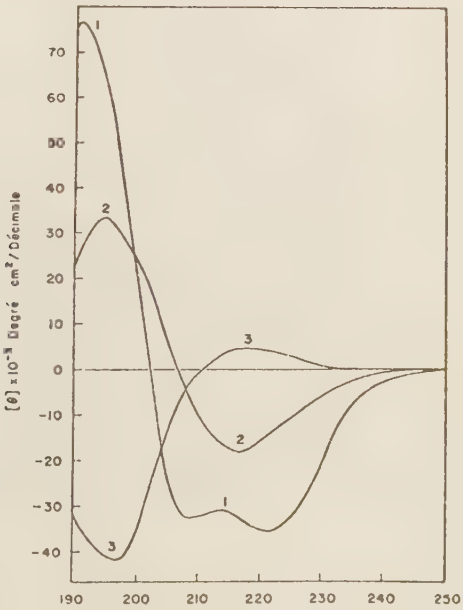


Figure 22: Spectre CD de poly-Lys

1) hélice α

2) conformation β

3) conformation "random coil"

TABLEAU IX

longeur d'onde	ellipticité molaire · 10^{-3}
197 nm	-59,33 deg·cm^2·$dmole^{-1}$
220 nm	9,9 --"--

Les spectres CD dans le domaine de l'UV lointain pour le collagène et la poly-L-proline II, diffèrent entre eux pour plusieurs raisons :

- La différence considérable dans les niveaux d'énergie entre les absorptions des liaisons peptidiques des seuls résidus pyrrolidones et des résidus acides aminés nouveaux
- L'entrelacement très serré des trois brins pour former la triple hélice de collagène
- L'hélicité particulière des hélices primaires
- L'existence possible de régions sans conformation fixe, ou flexible, dans la molécule
- L'absence d'une stricte répétition d'une séquence composante donnée.

Plusieurs études faites avec des polymères de tripeptides, de séquences diverses ((Pro-Ser-Gly)$_n$, (Pro-Ala-Gly)$_n$, (Pro-Pro-Gly)$_n$, (Ser-Pro-Gly)$_n$ (88,89)), ont montré que le rapport acides iminés/acides aminés est un facteur primordial - ce qui est reflété par les propriétés optiques de la triple hélice de collagène - mais aussi que la position de l'acide iminé dans la séquence du tripeptide est essentielle pour la formation d'une conformation "collagène".

4. CONCLUSIONS

Le but de notre travail était de caractériser aussi complètement que possible le collagène soluble en milieu acide organique dilué sans traitement protéolytique. Nous avons axé nos recherches sur le collagène extrait de veines saphènes d'origine bovine dans le but d'étendre par la suite l'étude comparée avec le collagène de la veine saphène humaine variqueuse.

Nous avons réussi à purifier puis à isoler un collagène de type I, contaminé, ni par d'autres collagènes, ni par des polysaccharides également présents dans la paroi veineuse. Nous avons déterminé les paramètres physico-chimiques suivants :

- poids moléculaire
- composition en acides aminés
- composition en hydrates de carbone
- paramètres physiques de la molécule observée au microscope électronique.

Ce collagène, comme celui extrait par une solution d'acide citrique diluée correspond bien aux critères permettant de le classer parmi les collagènes de type I, avec toutefois quelques différences essentielles qui sont les suivantes :

- Le contenu en Gly est plus faible que généralement admis. Les résidus Ser, et surtout Tyr sont plus nombreux, témoignant de l'intégrité de la molécule de tropocollagène, et notamment des extensions peptidiques, résultats d'ailleurs confirmé par les images au microscope électronique.
- La composition en hydrates de carbone est étonnante pour un collagène de ce type, car en plus des unités saccharidiques habituelles liées à l'hydroxylysine, nous avons décelé la présence de Xyl et de Man et de quantités moindres d'acides sialiques, d'acides hexuroniques et de GlcN. Si malheureusement nous n'avons pu exactement localiser ces unités saccharidiques supplémentaires, nous pouvons raisonnablement penser qu'elles ne proviennent pas de contaminations.

Avant d'entreprendre une étude semblable sur des collagènes provenant de veines variqueuses, il serait intéressant d'approfondir les sujets suivants qui, à notre avis, peuvent amener à mieux comprendre le rôle biologique exact du collagène dans ce tissu conjonctif particulier et ses relations avec les hydrates de carbone :

- localisation et détermination exacte des nouvelles unités saccharidiques
- purification et caractérisation des hétéropolysaccharides de la paroi veineuse
- détermination des interactions collagènes-hétéropolysaccharides
- distribution et localisation à l'intérieur même de la paroi veineuse des différents collagènes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Traub W., Piez K.A., Adv.Prot.Chem. 25 (1971) 243
2. Bornstein P., Piez K.A., J.Clin.Invest. 43 (1964) 1813
3. Chevalier O., Herbage D., Grimaud J.A., Communication au 6th Colloquium of the Federation on Eur. Connective Tissue Clubs, août 1978, Créteil (France)
4. Brown R.A., Shuttleworth C.A., Weiss J.B., Biochem.Biophys. Res.Comm. 80 (1978) 866
5. Kefalides N.A., Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol.I (Balazs E.A. ed) Acad.Press (1970) London et N-Y, pp 553
6. Burgeson R.E., El Adli F.A., Kaitila I.I., Hollister D.W., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73 (1976) 2579
7. Bentz H., Glanville R., Kühn K., Communication au 6th Colloquium of the Federation on Eur. Connective Tissue Clubs, août 1978, Créteil (France)
8. Rhodes R.K., Miller E.J., Biochemistry 17 (1978) 3443
9. Grant M.E., Jackson D.S., Essays in Biochemistry, Vol 12 (Campbell P.N., Aldbridge W.N.ed) Academic Press, London et N-Y (1976) pp. 77-113
10. Tanzer M., Science 180 (1973) 561
11. Bornstein P., Ann.Rev.Biochem. 43 (1974) 567
12. Legrand Y.J., Fauvel F., Kartalis G., Caen J.P., Communication au 6th Colloquium of the Federation on Eur. Connective Tissue Clubs, août 1978, Créteil (France)
13. Svejcar J., Prerovsky I., Linhart J., Kruml J., Circulat. Res. 11 (1962) 296
14. Laszt L., "Die Venenwand" (Rüttner J.R., Leu H.J. ed) Huber Verlag (1971) Berne, pp. 105-111
15. Svejcar J., Prerovsky I., Linhart J., Kruml J.,Beckova B., Clin. Sci. 24 (1963) 325
16. Bianco M.A., Thèse de doctorat, Ecole de chimie, Université de Genève (1979)
17. Bargetzi J. P., Jampen M., Angiologica 9 (1972)257 (125)

18. Schofiels J.D., Freeman I.L., Jackson D.S., Biochem.J. 124 (1971) 467
19. Steven F.S., Biochim. Biophys.Acta 140 (1970) 522
20. Fauré-Fremiet E., C.r.Soc.Biol.Paris 113 (1933) 715
21. Stark M., Kühn K., Eur.J.Biochem. 6(1968)534
22. Miller E.J., Biochemistry 10 (1971) 1652
23. Reisfeld R.A., Lewis U.J., Williams D.E., Nature 195 (1962) 281
24. Nagai Y., Gross J., Piez K.A., Ann.N.A.S. 121 (1964) 495
25. Moor S., Stein W.H., Methods in Enzymology 6 (Colowick S., Kaplan N.O. ed) Acad.Press N-Y (1963) pp. 819-831
26. Lin T.Y., Chang Y.H., J.Biol.Chem. 246 (1971) 2842
27. Cresfield A.M., Moor S., Stein W.H., J.Biol.Chem. 238 (1963) 622
28. Gürter R.G., J.Chromatog. 76 (1973) 255
29. Henkel W., Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356 (1975) 567
30. Bailey A.J., Sims T., Biochem.J. 153 (1976) 211
31. Sykes B.C., FEBS Letters 61 (1976) 180
32. Nordwig A., Rogall E., Hayduk U., Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol I (Balazs E.A.ed) Acad.Press (1970) London et N-Y, pp. 27
33. Hulmes D.J.S., Miller A., Parry D.A.D., Piez K.A., Woodhead-Galloway J., J.Mol.Biol. 79 (1973) 137
34. Chung E., Keel E.M., Miller E.J., Biochemistry 13(1974)3459
35. Piez K.A., Miller E.J., Lane J.M., Butler W.T., Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol I (Balazs E.A. ed) (1970) London et N-Y, pp. 117
36. Ackers G.K., Adv.Prot.Chem. 24 (1970) 323
37. Weber K., Osborn M., J.Biol.Chem. 244 (1969) 4406
38. Furthmayr H., Timpl R., Anal.Biochem. 41 (1971) 510
39. Goldberg R.J., J.Phys.Chem. 57 (1953) 194
40. Lewis M.S., Piez K.A., Biochemistry 3 (1964) 1126
41. Rice R.V., Casassa E.F., Kerwin R.E., Maser M.D., Arch. Biochem. Biophys. 105 (1964) 409
42. Kimura S., Matsura F., J.Biochem. 75 (1974) 1231
43. Mc Clain P.E., J.Biol.Chem. 249 (1974) 2303

44. Huxley H.E., Zubay G., J.Mol.Biol. 2 (1960) 10-18, 189-196
45. Grassmann W., Scleich H., Biochem. Z. 277 (1935) 320
46. Gross J., Dumsha B., Glanzer N., Biochem. Biophys. Acta 30 (1958) 293
47. Blumenfeld O.O., Paz M.A., Gallop P.M., Seifter S., J. Biol. Chem. 238 (1963) 3835
48. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Anal. Chem. 28 (1956) 350
49. Lehnhardt W.F., Winzler R.J., J.Chromatog. 34 (1968) 471
50. Kim J.H., Shome B., Liao T.H., Pierce J.G., Anal. Biochem. 20 (1967) 258
51. Operating Manual, Regis Chemical Co. (1967)
52. Trevelyan W.E., Proctor D.P., Harrison J.S., Nature 166 (1950) 444
53. Wardi A.H., Allen W.S., Varna R., Anal. Biochem. 57 (1974) 268
54. Skoza L., Mohos S., Biochem. J. 159 (1976) 457
55. Spiro R.G., Methods in Enzymology 28 (Ginsburg V. ed.) Acad. Press New-York (1972) p. 3
56. Simpson D.L., Hranisavljevic J., Davidson E.A., Biochemistry 11 (1972) 1849
57. Downs F., Pigman W., Methods Carbohydr. Clin. Vol VII (1976)
58. Smith D.F., Anal. Biochem. 71 (1976) 106
59. Spiro R.G., J. Biol. Chem. 242 (1967) 4813
60. Spiro R.G., J. Biol. Chem. 244 (1969) 602
61. Grant M.E., Jackson D.S., Biochem. J. 108 (1968) 587
62. Bosmann H.B., Jackson J.J., Biochim. Biophys. Acta 170 (1968) 6
63. Katzman R.L., Kang A.H., J. Biol. Chem. 247 (1972) 5486
64. Katzman R.L., Jeanloz R.W., Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Vol I (Balazs E.A. ed.) Acad. Press (1970) London et New-York, pp. 217
65. Radhakrishnamurthy B., Ruiz H.A., Berenson G.S., J. Biol. Chem. 252 (1977) 4831
66. Mathews M.B., Biochem J. 96 (1965) 710

67. Muir H., Hardingham T.E., MTP International Review of Science, Vol 5, Butterworths University Park Press (1975) pp. 153

68. Anderson J.C., Labedz R.I., Kewley M.A., Biochem. J. 168 (1977) 345

69. Beeley J.C., Biochem. Soc. Symp. 40 (1974) 27 Printed in Great Britain

70. Herbage D., Lucas J.-M., Huc A., Biochim. Biophys. Acta 336 (1974) 108

71. Wissler J.H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358 (1977) 1300

72. Moczar M., Moczar E., Robert L., Biochimie 59 (1977) 141

73. Baker J.R., Caterson B., Biochim. Biophys. Acta 532 (1978) 345

74. Fietzek P.P., Allman H., Rauterberg J., Wachter E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1977) 84

75. Glanville R.W., Allman H., Fietzek P.P., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357 (1976) 1663

76. Kleinman H.K., Mc Goodwin E.B., Klebe R.J., Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 (1976) 426

77. Heighberger J.H., Corbett C., Kang A.H., Gross J., Biochem. Biophys. Res Comm. 83 (1978) 43

78. Bailey A.J., Robins S.P., Balian G., Nature 251 (1974) 105

79. Brass L.F., Bensusan H.B., Biochim. Biophys. Acta 444 (1976) 43

80 Duksin D., Davidson J.M., Bornstein P., Arch. Biochem. Biophys. 185 (1978) 326

81. Aguilar J.H., Jacobs H.G., Butler W.T., Cunningham L.W., J. Biol. Chem. 248 (1973) 5106

82. Mc Lees B.D., Schleichter G., Pinell S.R., Biochemistry 16 (1977) 185

83. Panjawi N.A., Harding J.J., Biochem. J. 171 (1978) 687

84. Schwartz N.B., Dorfman A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 67 (1975) 1108

85. Brown F.R., Carver J.P., Blout E.R., J. Mol. Biol. 39 (1969) 307

86. Dickerson R.E., The Proteins; composition, structure and function. 2nd. ed., Vol II (Neurath H. ed.) Acad. Press (1964) New-York et London, pp. 603-778

87. Greenfield N.J., Fasman G.D., Biochemistry 8 (1969) 4108

88. Brown F.R., Di Corato A., Lorenzi G.P., Blout E.R., J. Mol. Biol. 63 (1972) 85

89. Kobayashi Y., Sakai R., Kakiuchi K., Isemura T., Biopolymer, 9 (1970) 415

90. Jackson D.S., Bentley J.P., in Treatise on Collagen, Vol II, Part A (Gould B.S. ed.) Acad. Press, London et New-York (1968) pp. 189-214

91. Glimcher M.J., in "Macromolecular Complexes" (Edds M.V.Jr ed.) Ronald Press, New-York (1961) pp. 53

92. Anderson J.C., Biochim. Biophys. Acta 379 (1975) 444

93. Bornstein P., Ann. Rev. Biochemistry 43 (1974) 567

94. Anttinen H., Oikarinen A., Ryhänen L., Kivirikko K.I., FEBS Letters 87 (1978) 222

95. Franzblau C., Schmid K., Faris B., Beldekas J., Garvin P., Kagan H.M., Baum B.J., Biochim. Biophys. Acta 427 (1976) 302

96. Bonnet F., Périn J.-P., Jollès P., Biochim. Biophys. Acta 532 (1978) 242